



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

Imię i nazwisko autora rozprawy: **Joanna Słabońska**
Dyscyplina naukowa: **Nauki Chemiczne**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Badanie możliwości selektywnego hamowania mikrobiologicznej syntazy ATP z wykorzystaniem metod modelowania molekularnego.

Tytuł rozprawy w języku angielskim: *Investigation of the possibility of selective inhibition of microbial ATP synthase using molecular modeling methods.*

Promotor

podpis

prof dr hab. inż. Jacek Czub

Gdańsk, rok 2025

OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: Joanna Słabońska

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:

<tytuł>

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 20.09.2025

.....
podpis doktoranta

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

Gdańsk, dnia 20.09.2025

.....
podpis doktoranta

**niepotrzebne usunąć*

¹ Art. 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: Joanna Słabońska

Tytuł rozprawy doktorskiej w języku polskim: Badanie możliwości selektywnego hamowania mikrobiologicznej syntazy ATP z wykorzystaniem metod modelowania molekularnego.

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Investigation of the possibility of selective inhibition of microbial ATP synthase using molecular modeling methods.

Język rozprawy doktorskiej: polski

Promotor rozprawy doktorskiej: Jacek Czub

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku polskim: ATPaza, Białka Motoryczne, Wiązania Wodorowe, Synteza, Bedakilina, Oligomycyna, Mechanizm Reakcji

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku angielskim: ATPase, Motor Protein, Hydrogen Bond, Synthesis, Bedaquiline, Oligomycin, Reaction Mechanism

Streszczenie rozprawy w języku polskim:

Kompleks F_0 syntazy ATP jest błonowym silnikiem obrotowym, sprzęgającym transport protonów z ruchem c-pierścienia i umożliwiającym syntezę ATP. Mechanizm jego działania i sposób inhibicji, mimo dostępnych struktur wysokiej rozdzielczości, pozostawały nie w pełni poznane. W tej pracy, wykorzystując pełnoatomową dynamikę molekularną i symulacje hybrydowe QM/MM, zbadalam podstawy kierunkowej rotacji c-pierścienia oraz mechanizmy inhibicji przez dwa związki: bedakilinę (Bq) i oligomycynę (Olg).

Moje analizy wykazały, że transfer protonu przebiega zgodnie z mechanizmem „dziury protonowej”, a kluczową rolę w utrzymaniu kierunkowości rotacji odgrywa zakonserwowana reszta Arg176 w podjednostce α , separująca półkanały: wiążący i uwalniający. W przypadku Bq jej zdolność wiązania z F_0 wynika z obecności krótkiego, silnego wiązania wodorowego (SSHB) z Glu65, wzmacnianego przez resztę charakterystyczną dla mykobakterii Asp32. Oligomycyna natomiast stabilizuje kompleks dzięki oddziaływaniom dyspersyjnym oraz klasycznemu wiązaniu wodorowemu z Glu65, pośredniczonym przez cząsteczkę wody. Oba inhibitory, mimo odmiennych mechanizmów, blokują rotację c-pierścienia, lokując się na jego interfejsie z podjednostką α i zatrzymując działanie syntazy ATP. Wyniki dostarczają nowego wglądu w sprzężenie chemiosmotyczne i podkreślają znaczenie krótkich, silnych wiązań wodorowych w projektowaniu inhibitorów.



Streszczenie rozprawy w języku angielskim:

The F_o complex of ATP synthase is a rotary membrane motor that couples proton transport with c-ring rotation, enabling ATP synthesis. Despite the availability of high-resolution structures, its mechanism of action and mode of inhibition have remained incompletely understood. In this work, using all-atom molecular dynamics and hybrid QM/MM simulations, I investigated the principles of directional c-ring rotation as well as the mechanisms of inhibition by two compounds: bedaquiline (Bq) and oligomycin (Olg).

My analyses revealed that proton transfer proceeds according to the "proton hole" mechanism, and that a conserved Arg176 residue in subunit *a*, which separates the binding and release half-channels, plays a key role in maintaining rotational directionality. In the case of Bq, its binding ability to F_o arises from the presence of a short, strong hydrogen bond (SSHB) with Glu65, essential for proton transfer, further reinforced by the mycobacteria-specific Asp32 residue. Oligomycin, in turn, stabilizes the complex through dispersive interactions and a classical hydrogen bond with Glu65 mediated by a bridging water molecule. Despite their distinct binding modes, both inhibitors block c-ring rotation by occupying its interface with the stationary subunit *a*, thereby halting ATP synthase activity. These findings provide new insights into the principles of chemiosmotic coupling and highlight the importance of short, strong hydrogen bonds in the design of novel inhibitors.

Na wstępie pragnę podziękować samej sobie za wytrwałość, determinację i konsekwencję w dążeniu do realizacji tego wymagającego projektu badawczego. Dzięki cierpliwości, pracy i sile charakteru udało mi się sprostać napotkanym trudnościom i zakończyć niniejszy projekt badawczy przedstawioną dysertacją.

Wyrazy wdzięczności kieruję do mojego promotora, **prof dr hab. inż. Jacka Czuba**, którego wsparcie merytoryczne i wskazówki naukowe były dla mnie nieocenionym źródłem inspiracji. Jego zaangażowanie i otwartość na dyskusję pozwoliły mi rozwinąć umiejętności badawcze, a także spojrzeć na podejmowane zagadnienia z nowej perspektywy.

Szczególne miejsce w moich podziękowaniach zajmują moi **rodzice, mama Elżbieta i tata Sławomir**, którzy swoją wiarą we mnie i nieustannym wsparciem umożliwili mi spełnienie naukowych marzeń.

Dziękuję mojej **siostrze Magdalenie** za obecność i dodawanie mi siły w chwilach zwątpienia.

Dziękuję **Maciejowi** za cierpliwość, wyrozumiałość i motywację, które towarzyszyły mi w najtrudniejszych momentach.

Dziękuję **Oldze i Bartkowi**, którzy swoją przyjaźnią i wsparciem uczynili tę drogę bogatszą.

Dziękuję zespołowi naukowemu **Komputerowej Biofizyki Molekularnej** oraz **Pracownikom Katedry Chemii Fizycznej PG** za lata owocnej współpracy, inspirujące dyskusje i wszystkie cenne wskazówki, które przyczyniły się do rozwoju tej pracy.

Spis treści

Podziękowania	iv
Acknowledgments	v
Streszczenie	vi
Abstract	vii
Wykaz skrótów	viii
1 Wprowadzenie	1
1.1 Syntaza ATP	1
1.1.1 Budowa syntazy ATP	1
1.1.2 Mechanizm działania syntazy ATP	8
1.1.3 Mechanizm rotacji w obrębie kompleksu F_o	11
1.1.4 Transfer protonu jako podstawowy proces	16
1.2 Inhibitory syntazy ATP	17
1.2.1 Bedakilina – lek przeciwgruźliczy	18
1.2.2 Oligomycyna – inhibitor mitochondrialnej syntazy ATP	23
1.2.3 Potencjalne mechanizmy działania inhibitorów	24
1.3 Wiązanie wodorowe i jego znaczenie dla mechanizmu inhibicji białka F_o . .	26
2 Cele oraz zakres pracy	29
3 Metody obliczeniowe	32
3.1 Podstawy teoretyczne	32
3.1.1 Przybliżenie Borna-Oppenheimera	33
3.1.2 Twierdzenie Hellmanna-Feynmana	34
3.1.3 Teoria Funkcjonału Gęstości	35
3.1.4 Metoda Kohna-Shama	38
3.1.5 Zestawy funkcji bazowych	41
3.1.6 Metoda ścisłego wiązania oparta o teorię funkcjonału gęstości; DFTB	41
3.1.7 Mechanika Klasyczna	44
3.1.8 Algorytmy całkowania równań ruchu	45
3.1.9 Krok czasowy	47
3.1.10 Długości wiązań i więzy	48
3.1.11 Temperatura i ciśnienie	50
3.1.12 Periodyczne warunki brzegowe	53

3.1.13	Mechanika molekularna i pola siłowe	54
3.1.14	Elementy termodynamiki statystycznej	59
3.1.15	Energia swobodna	61
3.2	Procedury symulacyjne	68
3.2.1	Budowa systemów	68
3.2.2	Symulacje dynamiki molekularnej	72
3.2.3	Symulacje dynamiki molekularnej QM/MM	74
4	Wyniki i dyskusja	79
4.1	Mechanizm działania kompleksu F_o syntazy ATP	79
4.1.1	Mechanizm rotacji w obrębie kompleksu F_o	79
4.1.2	Mechanizm transferu protonów i indukcja jednokierunkowej rotacji c-pierścienia	82
4.1.3	Wpływ argininy na kierunkowość rotacji	85
4.2	Wpływ inhibitora na rotację kompleksu F_o na przykładzie bedakiliny . . .	87
4.2.1	Mechanizm tworzenia kompleksu białko-inhibitor	87
4.2.2	Analiza silnego wiązania wodorowego w aspekcie inhibicji kompleksu F_o przez Bq	92
4.2.3	Mechanizm inhibicji syntazy ATP przez bedakilinę	102
4.3	Mechanizm wiązania oligomycyny z białkiem F_o	104
4.4	Mechanizm inhibicji kompleksu F_o na przykładzie oligomycyny	106
	Wnioski	108
	Bibliografia	112
	Dorobek naukowy	130

Podziękowania

Badania zaprezentowane w tej dysertacji zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu Sonata Bis nr. 2017/26/E/NZ2/00472.

Dziękuję polskiemu centrum wysoko-sprawnych komputerów PLGrid (obejmującym HPC Centers: ACK Cyfronet AGH, PCSS) za udostępnienie zasobów obliczeniowych i wsparcie w ramach grantu nr. PLG/2022/015799.

Acknowledgments

This work was funded by the Polish National Science Centre under Sonata Bis grant No. 2017/26/E/NZ2/00472.

I gratefully acknowledge Polish high-performance computing infrastructure PLGrid (HPC Centers: ACK Cyfronet AGH, PCSS) for providing computer facilities and support within computational grant no. PLG/2022/015799.

Streszczenie

Kompleks F_o syntazy ATP jest błonowym silnikiem obrotowym, który sprzęga transport protonów z ruchem c -pierścienia, umożliwiając syntezę ATP. Mechanizm jego działania oraz sposób inhibicji, pomimo dostępności wysokorozdzielczych struktur, pozostawały niewystarczająco poznane. W niniejszej pracy, wykorzystując pełnoatomową dynamikę molekularną i symulacje hybrydowe QM/MM, zbadalam zarówno podstawy kierunkowej rotacji c -pierścienia, jak i mechanizmy inhibicji przez dwa małowymiarowe związki – bedakilinę (Bq) i oligomycynę (Olg).

Analizy, które przeprowadziłam, wykazały, że transfer protonu zachodzi zgodnie z mechanizmem „dziury protonowej” i że kluczową rolę w utrzymaniu kierunkowości rotacji c -pierścienia odgrywa zakonserwowana reszta Arg176 w podjednostce a , separująca dwa półkanały protonowe: wiążący i uwalniający. Dla inhibitora Bq stwierdziłam, że jego zdolność wiązania z kompleksem F_o wynika z obecności krótkiego, silnego wiązania wodorowego (SSHB) z Glu65, odpowiedzialnego za transfer protonów, wzmacnianego przez obecność reszty charakterystycznej dla mykobakterii Asp32. Oligomycyna natomiast tworzy stabilny kompleks poprzez oddziaływania dyspersyjne, wspomagane przez klasyczne wiązanie wodorowe z Glu65 poprzez mostkującą cząsteczkę wody.

Oba inhibitory, mimo odmiennego mechanizmu wiązania, blokują rotację c -pierścienia, lokując się na jego interfejsie z nieruchomą podjednostką a i skutecznie zatrzymując działanie syntazy ATP. Wyniki niniejszej pracy dostarczają nowego wglądu w zasady sprzężenia chemiosmotycznego oraz podkreślają znaczenie krótkich, silnych wiązań wodorowych w projektowaniu nowych inhibitorów.

Abstract

The F_o subcomplex of ATP synthase is a membrane-embedded rotary motor that couples proton translocation to the rotation of the c -ring, enabling ATP synthesis. Despite the availability of high-resolution structures, the detailed mechanism of its function and inhibition has remained insufficiently understood. In this work, using all-atom molecular dynamics and hybrid QM/MM simulations, I investigated both the basis of directional c -ring rotation and the inhibition mechanisms of two small-molecule compounds—bedaquiline (Bq) and oligomycin (Olg).

My analyses revealed that proton transfer proceeds via the proton-hole mechanism and that a strictly conserved Arg176 in the a -subunit plays a pivotal role in maintaining the directionality of c -ring rotation by separating the binding and release half-channels. For Bq, I found that its strong binding affinity to the F_o complex arises from the formation of a short, strong hydrogen bond (SSHB) with Glu65, a key residue in proton transfer, further reinforced by the presence of the mycobacteria-specific Asp32. In contrast, Olg stabilizes its binding primarily through dispersion interactions, complemented by a classical water-mediated hydrogen bond with Glu65.

Although Bq and Olg employ distinct binding mechanisms, both inhibitors converge on blocking c -ring rotation by locating at its interface with the stationary a subunit, thereby halting ATP synthase activity. These results provide new mechanistic insights into chemiosmotic coupling and highlight the critical role of short, strong hydrogen bonds in the rational design of novel inhibitors.

Wykaz skrótów

AIMD	Ab Initio Molecular Dynamics
ATPaza	ATP synthase
BAR	Bennet Acceptance Ratio
Bq	Bedaquiline
BSSE	Basis Set Superposition Error
DFT	Density Functional Theory
DFTB	Density Functional based Tight Binding
GGA	Generalized Gradient Approximation
HB	Hydrogen Bond
HF	Hartree-Fock
LDA	Local Density Approximation
LSDA	Local Spin Density Approximation
MD	Molecular Dynamics
MM	Molecular Mechanics
NBO	Natural Bond Orbital
Olg	Oligomycin
QM	Quantum Mechanics
PBC	Periodic Boundary Condition
PES	Potential Energy Surface
PMF	Potential of Mean Force
RMSD	Root-Mean Square Displacement
SSHB	Short Strong Hydrogen Bond
US	Umbrella Sampling
WHAM	Weighted Histogram Analysis Method
WT	Wild-Type

1 Wprowadzenie

1.1 Syntaza ATP

Syntaza ATP, inaczej F_1F_o -ATPaza lub po prostu F-ATPaza, jest jednym z najbardziej niezwykłych kompleksów białkowych. Stanowi rodzaj maszyny molekularnej o złożonej strukturze i mechanizmie działania [1]. Jej działanie polega na wykorzystaniu energii zmagazynowanej w gradiencie protonów w poprzek błon biologicznych (np. wewnętrznej błony mitochondrialnej) do syntezy ATP. Cząsteczka ATP (adenozyno-5'-trifosforan) posiada w swojej budowie tak zwane "wysokoenergetyczne" wiązania fosfodiesterowe, których hydroliza z powstaniem ADP (adenozyno-5'-difosforanu) i ortofosforanu dostarcza energii o znacznych wartościach (-30 kcal/mol w warunkach standardowych). Energia ta jest wykorzystywana w komórkach w celu realizacji różnych procesów endoergicznych, wymagających wykonania pracy chemicznej (synteza polimerów komórkowych przez enzymy anaboliczne), pracy transportu (pompy błonowe) oraz pracy mechanicznej (ruch białek motorycznych, takich jak miozyny i kinezyny).

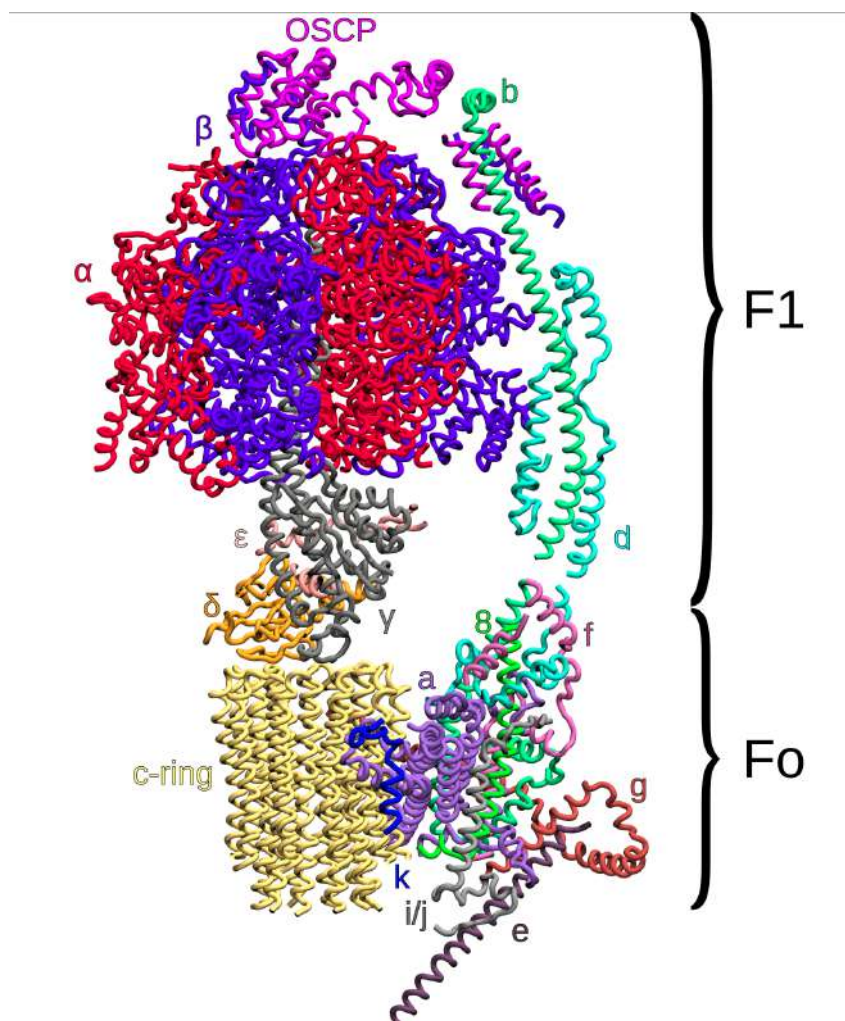
Warto zaznaczyć, że nie tylko ATP posiada wysokoenergetyczne wiązania. Do metabolitów o podobnych właściwościach należą m.in. fosfoenolopirogronian, fosforan karbamoilu, 2,3-bisfosfoglicerynian a także fosfageny takie, jak fosfoarginina lub fosfokreatyna. W toku ewolucji to jednak ATP stało się uniwersalnym nośnikiem energii użytecznej biologicznie, napędzając zdecydowaną większość procesów niesamorzutnych w komórce [2].

F-ATPaza występuje we wszystkich komórkach żywych, co podkreśla jej unikalną funkcjonalność. U drożdży i ssaków lokalizuje się w wewnętrznej błonie mitochondriów, zaś u roślin w błonach tylakoidów chloroplastów. W przypadku bakterii i innych organizmów prokariotycznych, które mają odmienną budowę komórkową, F-ATPaza umieszczona jest w błonie komórkowej [3, 4, 5, 6]. Warianty F-ATPazy występujące u organizmów odległych filogenetycznie różnią się szczegółami budowy i mechanizmu działania, jednak ogólny schemat strukturalny i funkcjonalny pozostaje niezmienny.

1.1.1 Budowa syntazy ATP

Syntaza ATP złożona jest z dwóch rotacyjnych białek motorycznych: zakotwiczonego w błonie kompleksu F_o oraz hydrofilowego kompleksu F_1 , tworząc w ten sposób oligomeryczne białko o masie około 600 kDa [7]. Strukturę pełnego kompleksu pochodzącego z mitochondrium drożdżowego *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 6B8H [8]) zaprezentowałam na Rys. 1.

Niedawne badania wykazały zdolność mitochondrialnej syntazy ATP do dimeryzacji i tertrameryzacji. Proces oligomeryzacji zachodzi w obrębie błony za pośrednictwem podjednostek białka F_o i prowadzi do silnego lokalnego wygięcia błony, co skutkuje fał-



Rysunek 1: Struktura pełnego kompleksu F1Fo-ATPazy z zaznaczonym kompleksem F_o osadzonym w błonie oraz hydrofilowym kompleksem F_1 ; PDB:6B8H [8]

dowaniem się błony i tworzeniem grzebieni mitochondrialnych (ang. *cristae*), które nadają mitochondriom charakterystyczny wygląd. Pofałdowanie skutkuje zwiększeniem powierzchni wewnętrznej błony mitochondrialnej. Daje to więcej przestrzeni do zakotwiczenia białek łańcucha oddechowego, co zwiększa efektywność oddychania komórkowego (fosforylacji oksydacyjnej) [9, 10]. W przypadku organizmów prokariotycznych struktury oligomeryczne nie zostały dotychczas zaobserwowane, co może wynikać z braku konieczności zwiększania powierzchni ich błony komórkowej na potrzeby fosforylacji oksydacyjnej.

Białko F_1

Struktura kompleksu F_1 została przeze mnie opisana na podstawie pierwszej uzyskanej struktury krystalicznej tego białka (PDB: 1COW) [11]). Należy jednak zaznaczyć, że budowa tego kompleksu jest silnie zakonserwowana u różnych organizmów. W każdym przypadku kompleks F_1 składa się z trzech podjednostek α , trzech podjednostek β oraz pojedynczych podjednostek γ i ϵ . W mitochondrialnym wariantcie F_1 dodatkowo wystę-

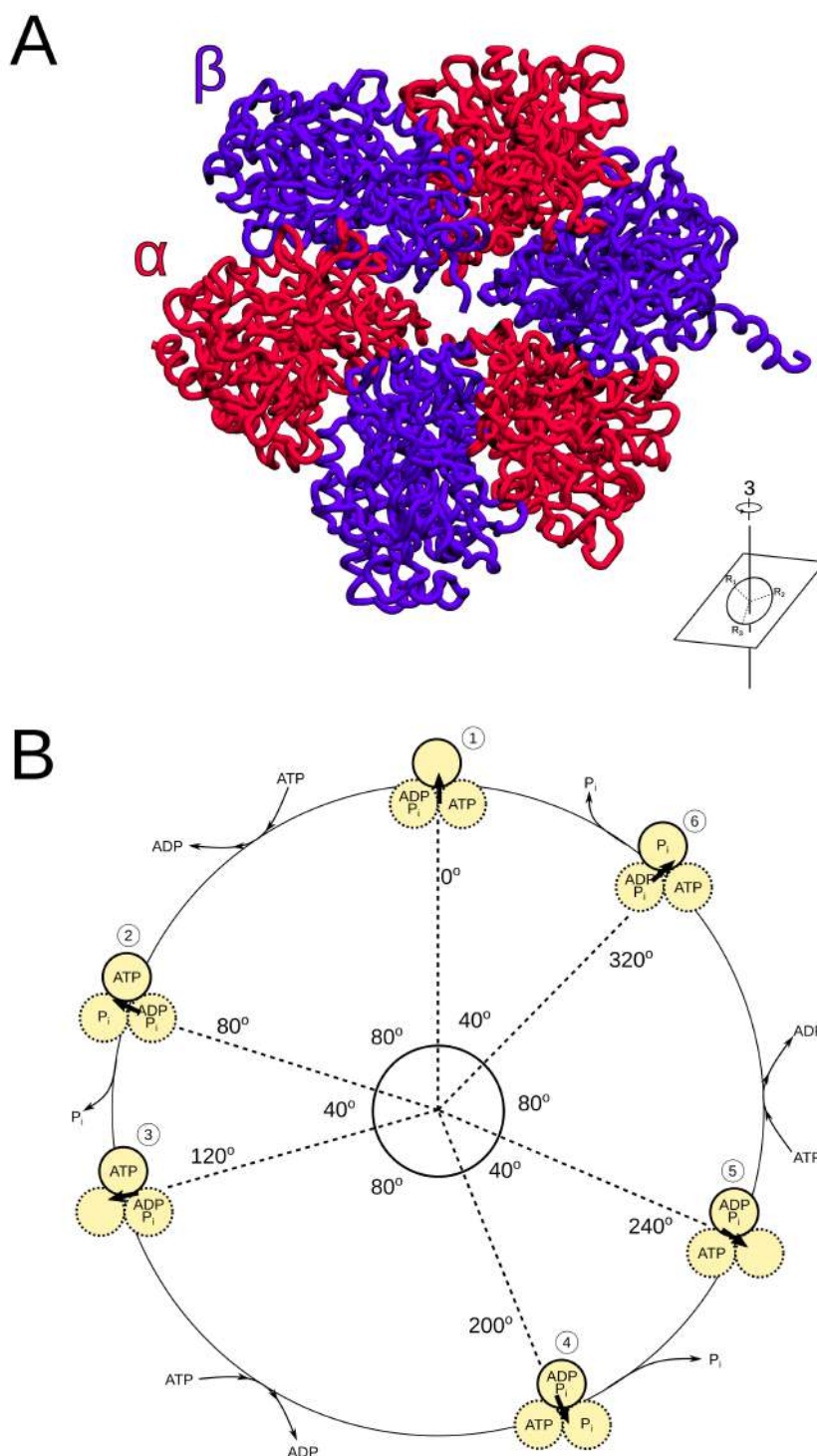
puje podjednostka δ . Podjednostki α oraz β ułożone są naprzemiennie, tworząc heksamer o trzykrotnej osi symetrii, który można także opisać jako kompleks trzech dimerów $\alpha\beta$ ($\alpha_3\beta_3$). Wewnątrz heksameru ulokowana jest asymetryczna podjednostka γ , nazywana γ -wałem (ang. *γ -shaft*) zbudowana z dwóch helis tworzących motyw typu zwiniętej cewki (ang. *coiled-coil*) [12, 13, 14, 15]. Podjednostki β pełnią kluczową rolę, jaką jest wiązanie nukleotydów. Na skutek oddziaływania z asymetryczną podjednostką γ mogą one różnić się konformacją oraz obsadzeniem centrów aktywnych przez nukleotydy (ATP, ADP). Badania krystalograficzne nad strukturami kompleksów F1 zidentyfikowały dwie podstawowe konformacje podjednostek β : "otwartą" i "zamkniętą" [16, 17, 1, 13]. Obserwowane w strukturach obsadzenia centrów aktywnych są także zróżnicowane i nie zawsze korelują ze stanem konformacyjnym. Zazwyczaj nukleotydy (ATP lub ADP) wiążą się do podjednostki β w konformacji zamkniętej, choć w przypadku wyższych stężeń obserwuje się je także związane do konformacji otwartej. W typowych sytuacjach ta ostatnia konformacja pozostaje jednak na ogół nieobsadzona, stąd zakłada się, że charakteryzuje się ona niższym powinowactwem do nukleotydów. Badania strukturalne wykazały także, że w zależności od położenia kąowego podjednostki γ , podjednostka β może przyjmować także konformacje pośrednie pomiędzy stanem otwartym i zamkniętym, określane jako konformacje "pół-otwarte" i "pół-zamknięte" [18, 19, 15].

Jak szczegółowo opiszę to poniżej, w trakcie cyklu katalitycznego F₁-ATPazy obracająca się podjednostka γ powoduje, że każda z podjednostek β przechodzi przez każdą konformację. Następuje wówczas sekwencja obejmująca wiązanie ADP i P_i , syntezę ATP oraz uwolnienie produktu. Role podjednostek zmieniają się cyklicznie podczas obrotu podjednostki γ w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara (patrząc od strony błony mitochondrialnej, co odpowiada obrotowi w kierunku syntezy [12]. Mimo że kieszeń wiążąca nukleotydy tworzona jest głównie przez aminokwasy podjednostki β , jej istotnym elementem jest także tzw. palec argininowy pochodzący z sąsiedniej podjednostki α . Koordynuje on γ -fosforan w związanej cząsteczce ATP [12].

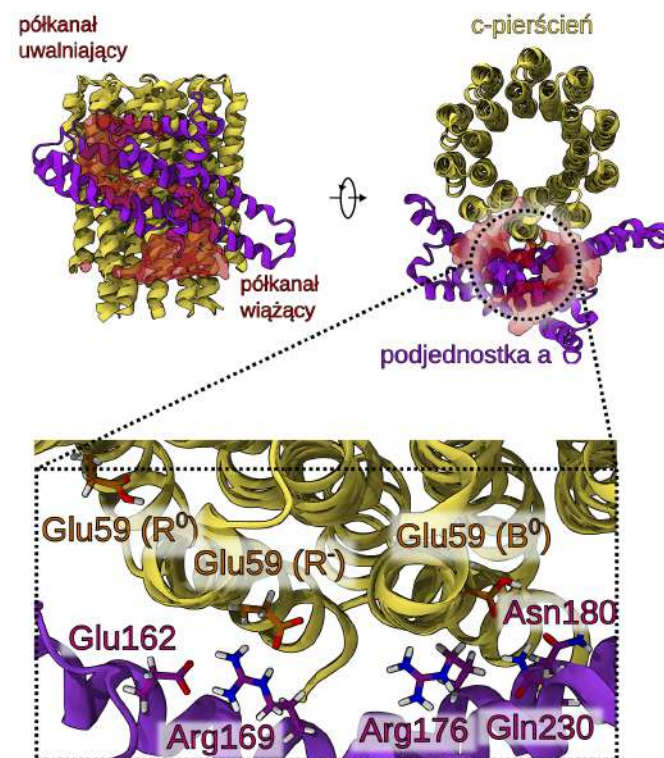
Badania strukturalne wykazały także, że podjednostki α , będąc ewolucyjnymi ortologami podjednostek β , również wiążą ATP. Nie mają one jednak zdolności do jego hydrolizowania, w związku z czym związane przez nie nukleotydy pełnią w trakcie cyklu katalitycznego wyłącznie rolę strukturalną.

Białko F_o

Transbłonowy kompleks F_o jest tworzony przez kilka różnych podjednostek, których konkretny skład i budowa różnią się między organizmami. Główną i w dużej mierze zakonserwowaną część F_o stanowią jednak podjednostki a , b oraz c -pierścień (ang. *c-ring*). c -pierścień jest cylindryczną strukturą zbudowaną z podjednostek c . Każda z nich składa się z dwóch transbłonowych α -helis połączonych elastycznym, hydrofilowym łącznikiem (ang.



Rysunek 2: (A) Struktura heksameru kompleksu F1 z zaznaczoną trójkrotną osią symetrii. (B) Schemat mechanizmu rotacji kompleksu F1. Podjednostki β przedstawiłam jako żółte kółka z zaznaczonym miejscem wiązania nukleotydu, podjednostkę γ przedstawiłam za pomocą strzałki. Dla przejrzystości nie umieściłam na rysunku podjednostek α . Podjednostka γ obraca w sześciu naprzemiennych krokach o 80° i 40° . Jedna z podjednostek β posiada pogrubione obramowanie i przypisany numer od 1 do 6. Zabieg ma na celu zaprezentowanie ścieżkę reakcji, którą przechodzi pojedyncza podjednostka od pozycji początkowej przy kącie 0° .



Rysunek 3: Budowa kompleksu F_o z zaznaczonymi półkanałami. Zaznaczono reszty w ramach interfejsu c -pierścień/podjednostka a , które są istotne dla mechanizmu działania białka.

helix-hairpin). Podjednostki te tworzą oligomeryczną strukturę o cylindrycznym kształcie z pierścieniem wewnętrznym i zewnętrznym. Liczba podjednostek c w c -pierścieniu jest zależna od organizmu i ściśle związana z wartością gradientu elektrochemicznego protonów. Najmniejsza liczba podjednostek tworzących c -pierścień znajduje się u ssaków (8) [5], natomiast największa u cyjanobakterii *Spirulina platensis* (15) [20]. W mitochondriach drożdży c -pierścień zbudowany jest z 10 podjednostek [7], natomiast w tylakoidach chloroplastów z 14 [6]. Najbardziej zmienny skład podjednostek c -pierścienia występuje w komórkach bakteryjnych i waha się od 9 u *Mycobacterium tuberculosis* [21] przez 10 u *Bacillus PS3* [22] po 11 u *Ilyobacter tartaricus* [23].

Kluczowym elementem strukturalnym c -pierścienia jest obecność reszty kwasu glutaminowego lub asparaginowego (w zależności od gatunku) zlokalizowanej w połowie długości helis zewnętrznych [24, 25] (Rys. 3). Jest to jedyna silnie polarna reszta aminokwasowa c -pierścienia osadzona w hydrofobowym rdzeniu błony. Pozostałe polarne reszty występują wyłącznie w części egzobłonowej, umożliwiając stabilne połączenie między kompleksami F_o i F_1 .

Drugim podstawowym elementem kompleksu F_o jest podjednostka a , złożona z sześciu α -helis. Cztery z nich oddziałują z podjednostką b [26, 27], która jest elementem łodygiperyferyjnej, co zostanie omówione poniżej. Dwie pozostałe, długie helisy, 5 i 6, zawijają się

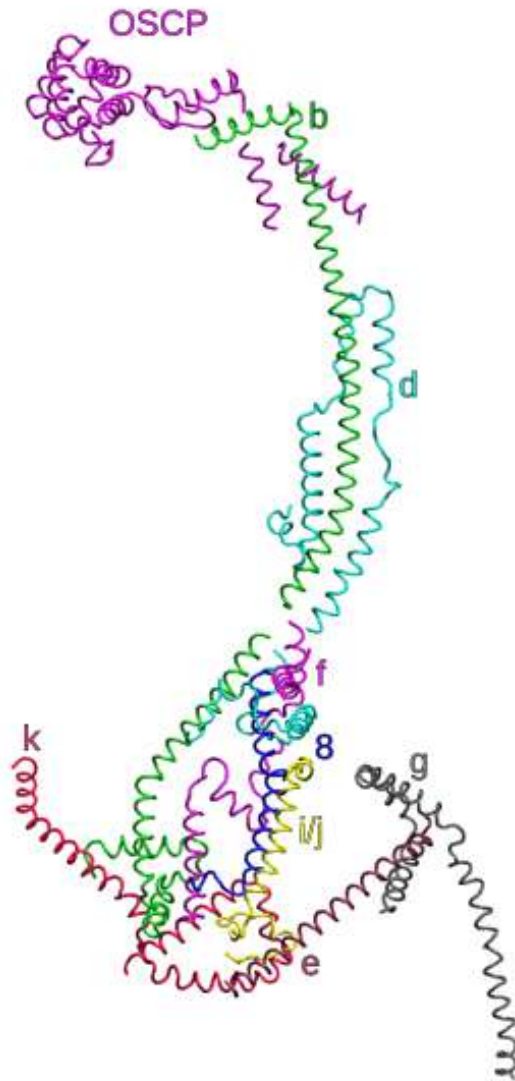
wokół c -pierścienia, tworząc kluczową powierzchnię kontaktu c -pierścień/podjednostka a (ang. *a/c interface*). Asymetryczne ułożenie helis podjednostki a względem c -pierścienia przedstawiłam na Rys. 3. Helisa 5 znajduje się bliżej przestrzeni perimitochondrialnej (lub periplazmy u prokariotów), natomiast helisa 6 – bliżej macierzy mitochondrialnej (lub odpowiednio cytozolu). Na skutek takiego ułożenia podjednostki a , na jej powierzchni kontaktu z c -pierścieniem tworzą się dwie przestrzenie wypełnione wodą, które nazywane są półkanałami. Stanowią one uwodnione połączenie pomiędzy roztworami z obu stron błony a centralnie zlokalizowanymi resztami Asp/Glu c -pierścienia. Półkanał łączący przestrzeń perimitochondrialną z c -pierścieniem jest określany jako półkanał wiążący (protony lub w rzadkich przypadkach jony sodowe), natomiast półkanał łączący c -pierścień z macierzą mitochondrialną to półkanał uwalniający [10, 28, 29, 30]. W związku z omówioną asymetrycznością podjednostki a warto zauważyć, że helisa 6 od strony przestrzeni perimitochondrialnej nie jest ściśle związana z c -pierścieniem, tworząc szczelinę, w której znajduje się łańcuch cząsteczek wody. Przebiegając pomiędzy helisami podjednostki a , umożliwia on protonom dotarcie do grupy karboksylowej kwasu glutaminowego c -pierścienia w półkanale wiążącym i jego sprotonowanie. Po przeciwnej stronie podjednostki a powierzchnia kontaktu jest bardziej zwarta i tworzy półkanał uwalniający. Znajdujące się w nim cząsteczki wody tworzą sieć, która umożliwia transfer protonu z grupy karboksylowej glutaminianu do środowiska wodnego macierzy mitochondrialnej. Struktura ta zapewnia efektywne odprowadzenie protonu po jego uwolnieniu z c -pierścienia, a jednocześnie utrzymuje separację od półkanału wiążącego, co zapobiega przeciekowi protonów i warunkuje kierunkowość transportu.

Kluczowym elementem podjednostki a jest reszta argininy, którą zaznaczyłam na rysunku 3. Położona jest ona centralnie, to znaczy w środku długości helisy 5, która jest odpowiedzialna za tworzenie interfejsu c -pierścień/podjednostka a . Reszta ta jest w pełni zakonserwowana we wszystkich scharakteryzowanych gatunkach. Taki stopień zakonserwowania tej reszty sugeruje jej istotną rolę w mechanizmie działania białka F_o , co zostanie szerzej omówione w rozdziale dotyczącym mechanizmu działania białka.

Dodatkowe podjednostki F_o , takie jak i/j , k , g , e oraz błonowa część podjednostki b biorą udział we wspomnianej powyżej oligomeryzacji syntazy ATP w obrębie błony [7, 10, 31].

Łodyga peryferyjna

W strukturze syntazy ATP wyróżnia się również łodygę peryferyjną (ang. *peripheral stalk*), zwaną także gałęzią boczną. Strukturę tę zaprezentowałam na Rys. 4. Składa się ona z podjednostek $OSCP$, d , F_6 , f , 8 oraz hydrofilowej części podjednostki b [7]. Jest to najslabiej strukturalnie scharakteryzowany element kompleksu syntazy ATP. Główną funkcją łodygi peryferyjnej jest zapobieganie nieproduktywnemu obrotowi syntazy ATP



Rysunek 4: Budowa łądygi peryferyjnej z zaznaczonymi resztami

(patrz: Mechanizm działania syntazy ATP). Stabilizuje ona wzajemną orientację heksameru $\alpha_3\beta_3$ oraz podjednostki a podczas sprzężonej rotacji c -pierścienia i podjednostki γ . Stanowi więc ważny element konstrukcyjny całego białka.

Kluczową podjednostką tworzącą gałąź boczną jest podjednostka b , występująca we wszystkich organizmach posiadających w komórkach F-ATPazę. Jej N-końcowy region jest zakotwiczony w błonie jako α -helisa, natomiast pozostała część wystaje ponad błonę jako wysoce naładowana struktura α -helikalna. Topologiczne podobieństwo podjednostki b między organizmami bakteryjnymi a mitochondrialnymi sugeruje, że pełni ona podobną funkcję niezależnie od gatunku.

Podjednostki $OSCP$, b , d , F_6 , e , f , g , a także błonowe podjednostki j i k , tworzą trzon łądygi peryferyjnej, którego zadaniem jest utrzymanie statycznych elementów białek F_o i F_1 w stabilnym ułożeniu względem siebie [32]. Dzięki połączeniu tych elementów

za pośrednictwem gałęzi bocznej indukowany przepływem ruch c -pierścienia może być wydajnie przeniesiony na ruch podjednostki γ wewnątrz katalitycznego heksameru $\alpha_3\beta_3$ bez wywoływania nieproduktywnego obrotu całego heksameru [32].

1.1.2 Mechanizm działania syntazy ATP

Syntaza ATP jest złożonym kompleksem białkowym, i jak zostało wspomniane wcześniej, odpowiada za konwersję energii zgromadzonej w gradiencie elektrochemicznym protonów (dużo rzadziej jonów sodu) do energii wiązań fosfodiesterowych w cząsteczce ATP. Proces ten jest realizowany przez dwa rotacyjne białka motoryczne F_o oraz F_1 , które są połączone ze sobą przeciwstawnie w strukturze holoenzymu syntazy ATP. W ramach kompleksu F_o energia zmagazynowana w gradiencie elektrochemicznym protonów jest zamieniana na energię mechaniczną rotacji, która przekazana do kompleksu F_1 zostaje następnie skonwertowana do energii chemicznej wiązań w ATP.

Pomiędzy dwoma stronami błony mitochondrialnej występuje gradient potencjału elektrochemicznego protonów. Powstaje on w wyniku nałożenia się na siebie efektu "chemicznego" (różnica stężeń protonów) oraz elektrostatycznego (napięcie w poprzek błony). W ostatnim etapie oddychania wewnątrzkomórkowego, w procesie łańcucha oddechowego, kosztem spontanicznego przepływu elektronów do akceptorów o coraz wyższym potencjale redukcyjnym dochodzi do aktywnego transportu protonów z powstaniem różnicy ich stężeń po dwóch stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej. W metabolizującej komórce stężenie protonów jest na ogół około dziesięciokrotnie wyższe po stronie perimitochondrianej niż po stronie macierzy mitochondrialnej. Dodatkowo na skutek nierównowagi stężeń kationów i anionów na błonie tej występuje spadek potencjału elektrostatycznego rzędu 150 mV (potencjał elektrostatyczny jest niższy po stronie macierzy) [24]. W efekcie powstałego gradientu potencjału elektrochemicznego protony mają tendencję do spontanicznego przepływu do macierzy mitochondrialnej, co można wykorzystać do wykonania użytecznej pracy (w ilości ok. 15 kJ/mol w przeliczeniu na jeden przepływający proton).

W komórkach za wykonanie tej pracy odpowiada kompleks F_o , który jest białkiem motorycznym sprzęgającym przepływ protonów z ruchem obrotowym c -pierścienia wokół własnej osi względem nieruchomej podjednostki a . Mechanizm tego sprzężenia opiera się na obecności w obrębie c -pierścienia grupy karboksylowej kwasu glutaminowego (lub asparaginowego), która dzięki zdolności do przyjmowania i uwalniania protonów umożliwia ich transport, przemieszczając się pomiędzy półkanałem wiążącym i uwalniającym. Dzięki temu, że przemieszczenie to polega na obrocie o niemal 360° transport protonów stowarzyszony jest z rotacją c -pierścienia. Szczegółowo mechanizm funkcjonowania białka F_o zostanie omówiony poniżej.

Rotacja c -pierścienia indukuje obrót podjednostki γ [33] wewnątrz heksameru $\alpha_3\beta_3$ białka F_1 . Jest to możliwe dzięki oddziaływaniom o charakterze hydrofilowym, w szcze-

gólności wiązaniom wodorowym. Tworzone są one między argininami dwóch podjednostek *c*-pierścienia (Arg38 w *Escherichia coli*) z odpowiednio asparaginą (Asn243) i glutaminą (Gln260) z podjednostki γ . Ponadto w przypadku mitochondrialnego enzymu, w którym dodatkowo występuje podjednostka δ , tworzone są także stabilizujące wiązania wodorowe między argininą (Arg38) *c*-pierścienia a grupą peptydową proliny (Pro47) z podjednostki δ i argininą (Arg234) podjednostki γ [34, 35].

Co należy mocno podkreślić, proces syntezy ATP realizowany przez białko F_1 jest mikroskopowo odwracalny, co oznacza, że może ono także hydrolizować ATP, np. wtedy gdy gradient protonowy spadnie poniżej pewnego poziomu lub wtedy gdy jest to metabolicznie pożądanym efektem (u organizmów beztlenowych F_1 -ATPaza pełni rolę pompy protonowej). Obserwowany kierunek rotacji syntazy ATP jest wynikiem sprzężenia dwóch molekularnych silników rotacyjnych, działających w przeciwnych kierunkach. Białko F_1 jest napędzane różnicą potencjałów chemicznych między ATP i ADP/P_i , natomiast białko F_o poprzez gradient protonowy. Dopóki gradient protonów jest dostatecznie wysoki, holoenzym F_1 -ATPazy realizuje syntezę ATP. Jednak w sytuacji, gdy gradient protonowy nie wystarcza do "pokonania" różnicy potencjałów chemicznych między ATP i ADP/P_i , rotacja zachodzi w przeciwnym kierunku, a wypadkowym efektem działania enzymu jest hydroliza ATP i pompowanie protonów wbrew gradientowi.

Z uwagi na mikroskopową odwracalność zarówno reakcji syntezy/hydrolizy ATP, jak i samego cyklu zmian konformacyjnych w syntazie ATP, badania nad mechanizmem działania tego kompleksu prowadzi się często w wariancie hydrolitycznym. W kontekście metod doświadczalnych podejście to jest szczególnie korzystne, bowiem umożliwia badanie złożonej dynamiki konformacyjnej białka F_1 bez konieczności wymuszania ruchu podjednostki γ np. z wykorzystaniem "szczypców" optycznych lub białka F_o i gradientu protonowego. Podobnie można postąpić w badaniach *in silico*, co pozwala się skupić na lokalnych zmianach strukturalnych, interakcjach między podjednostkami (np. rotacji γ -wału względem heksamery $\alpha_3\beta_3$) i przebiegu reakcji katalitycznej w centrach aktywnych z zastosowaniem technik symulacji dynamiki molekularnej. W badaniach eksperymentalnych cyklu hydrolitycznego do śledzenia zmian konformacyjnych wykorzystuje się takie metody jak FRET, cryo-EM czy rejestracja rotacji pojedynczych cząsteczek przy użyciu technik optycznych. Wariant ten umożliwia precyzyjne wyznaczenie zależności kinetycznych i strukturalnych w cyklu enzymatycznym. Należy jednak podkreślić, że w warunkach fizjologicznych syntaza ATP działa głównie w kierunku syntezy, napędzana przez elektrochemiczny gradient protonowy. Proces ten jest bardziej złożony, ponieważ wymaga odwzorowania sprzężenia translokacji protonów z mechanizmem rotacyjnym oraz z reakcją chemiczną.

Bazując na strukturze i mechanizmie działania podjednostki F_1 syntazy ATP w kierunku hydrolizy ATP (przedstawionej na rysunku 2), można wyróżnić szereg następujących po sobie etapów napędzanych rotacją centralnej podjednostki γ . Asymetryczna pod-

jednostka γ jest osadzona w centralnym kanale utworzonym przez katalityczny heksamer złożony z trzech dimerów $\alpha\beta$, tworzących podjednostkę $\alpha_3\beta_3$ o trójkrotnej symetrii. Obrót podjednostki γ wewnątrz heksameru prowadzi do sekwencji skoordynowanych zmian konformacyjnych trzech podjednostek β , w obrębie których znajdują się miejsca aktywne katalitycznie [1, 13]. Punkt wyjścia stanowi stan konformacyjny układu odpowiadający kątowi obrotu γ równemu 0° . W tym stanie jedna z podjednostek β znajduje się w konformacji pół-zamkniętej (ang. *loose*), zawierając związane ATP [18]. Gdy na sąsiedniej podjednostce β dochodzi do hydrolizy ATP, opisywana podjednostka ulega przejściu do konformacji zamkniętej (ang. *tight*), również z cząsteczką ATP związaną w centrum aktywnym. Zmiana ta zachodzi na zasadzie indukowanego dopasowania (ang. *induced fit*), w którym wiązanie ATP stabilizuje konformację miejsca aktywnego, ułatwiając tym samym proces katalizy [36]. Jednocześnie hydroliza ATP w innej podjednostce β dostarcza energii, która destabilizuje interakcje w obrębie dimeru $\alpha\beta$ i przekazywana jest na centralną podjednostkę γ . W tym momencie energia chemiczna zostaje przekształcona w energię mechaniczną, a podjednostka γ wykonuje obrót o około 80° , co inicjuje rotacyjny cykl enzymu [13, 37]. W wyniku tej rotacji tzw. „palec argininowy” z podjednostki α , czyli kluczowa reszta katalityczna, zostaje przesunięty w pobliże γ -fosforanu cząsteczki ATP, aktywując kolejny etap cyklu [16, 1]. W kolejnym etapie rotacja podjednostki γ wywołuje skoordynowane zmiany konformacyjne pozostałych podjednostek β . Obecnie wiadomo, że nie przechodzą one synchronicznie w stany „zamknięty” i „pół-zamknięty”, jak wcześniej przypuszczano. Zgodnie z aktualnym modelem, miejsce otwarte wiąże nową cząsteczkę ATP i niemal natychmiast przechodzi w stan ściśle zamknięty, co jest sprzężone z ruchem obrotowym o 80° . Równolegle sąsiednie miejsce produktowe uwalnia najpierw nieorganiczny fosforan (P_i), natomiast ADP zostaje uwolnione dopiero w kolejnym przełączeniu konformacyjnym. Dodatkowy podskok rotacyjny o 40° zamyka pełny krok 120° i przesuwa wszystkie trzy podjednostki β o jeden cykl konformacyjny [13, 37, 38]. Proces ten powtarza się trzykrotnie, aż do pełnej rotacji podjednostki o 360° , co odpowiada hydrolizie trzech cząsteczek ATP [13, 37, 19].

Mikrowideografia pojedynczych cząsteczek F_1 potwierdziła, że pełny obrót podjednostki γ o 120° składa się z dwóch podetapów rotacyjnych: pierwszego o $80\text{--}90^\circ$ i drugiego o $40\text{--}30^\circ$. Kroki te odpowiadają kolejno przejściom między dwoma stanami przejściowymi, określanymi jako stany zależne od ATP oraz stany katalityczne [18, 39]. Ponadto zidentyfikowany w mitochondrialnym kompleksie F_1 co najmniej jeden dodatkowy stan pośredni poprzedza uwolnienie fosforanu (lub fosforanu i ADP) [40, 41, 42].

Sam mechanizm katalityczny w ramach kompleksu F_1 jest procesem nie do końca wyjaśnionym. Zakłada się, że reakcja ta przebiega według schematu dysocjatywnej substytucji nukleofilowej z atakiem cząsteczki wody, którego celem jest γ -fosforan cząsteczki ATP. Obecność w kieszeni wiążącej reszty kwasu glutaminowego (lub asparaginowego) służy

aktywacji cząsteczki wody, ponieważ reszta ta pełni rolę uogólnionej zasady. Nie jest do-
tychczas jasne, co odpowiada za stabilizację powstającego stanu przejściowego [43].

Ze względu na to, że sekwencja zmian konformacyjnych w obrębie kompleksu F_1 jest napędzana przez rotację c -pierścienia w kompleksie F_o , naturalnym jest, że efektywność obu tych procesów jest ze sobą ściśle powiązana. Oznacza to, że sprawność i dynamika rotacji c -pierścienia bezpośrednio wpływa na przebieg i tempo konformacyjnych przejść w kompleksie F_1 , a z kolei stan konformacyjny podjednostek F_1 może oddziaływać na ruch c -pierścienia, tworząc sprzężenie zwrotne między tymi dwoma częściami syntazy ATP. We wszystkich wariantach białko F_1 zawiera katalityczny heksamer $\alpha_3\beta_3$ o symetrii trójkrotnej, natomiast liczba podjednostek c -pierścienia jest zależna od gatunku. W efekcie pełny obrót rotora c -pierścień/podjednostka γ wiąże się z wykonaniem różnej liczby kroków rotacyjnych c -pierścienia. Oznacza to, że im więcej monomerów zawiera c -pierścień, tym więcej protonów jest przenoszonych w przeliczeniu na syntezę pojedynczej cząsteczki ATP [44]. Z termodynamiki wynika zatem, że przy większej liczbie monomerów proces może przebiegać przy niższych wartościach siły napędowej wynikającej z gradientu protonów [45]. Rzeczywiście, badania pokazują, że w syntazie ATP praca rotacji generowana przez przepływ protonów jest niemal równa zmianie energii swobodnej w reakcji syntezy ATP w warunkach fizjologicznych ($\delta\mu$) [46]. Sugeruje to, że białko to działa jako wysoce wydajny mechanochemiczny przetwornik energii swobodnej przy niemal 100% wydajności termodynamicznej. Jest to możliwe na skutek ścisłego sprzężenia mechanochemicznego, co oznacza, że podczas każdego cyklu rotacji podjednostki γ (czyli każdego "kroku" rotacyjnego) następuje precyzyjne związanie i przekształcenie jednej cząsteczki substratu w produkt – hydroliza ATP w kierunku hydrolitycznym lub synteza ATP w kierunku syntetycznym [47]. Krok odpowiada więc jednej trzystopniowej rotacji podjednostki γ o 120° , w trakcie której katalityczne podjednostki β przechodzą cykl konformacyjny prowadzący do powstania lub rozkładu jednej cząsteczki ATP. Tak precyzyjne sprzężenie minimalizuje straty energii na ciepło i pozwala na niemal całkowite wykorzystanie energii gradientu protonowego. Dla porównania, typowe silniki liniowe, takie jak miozyna czy kinezyrna – które poruszają się wzdłuż filamentów cytoszkieletu, przetwarzając energię hydrolizy ATP na ruch mechaniczny – cechują się znacznie niższą efektywnością energetyczną, często rzędu 40–60% ze względu na straty mechaniczne i termiczne [48, 49]. Stanowi więc to o wyjątkowości syntazy ATP. Mechanizm ścisłego sprzężenia wymaga, aby zmiany w obsadzeniu miejsc katalitycznych były ściśle powiązane ze skoordynowanymi przejściami konformacyjnymi heksameru $\alpha_3\beta_3$, a tym samym z mechanicznymi krokami podjednostki γ .

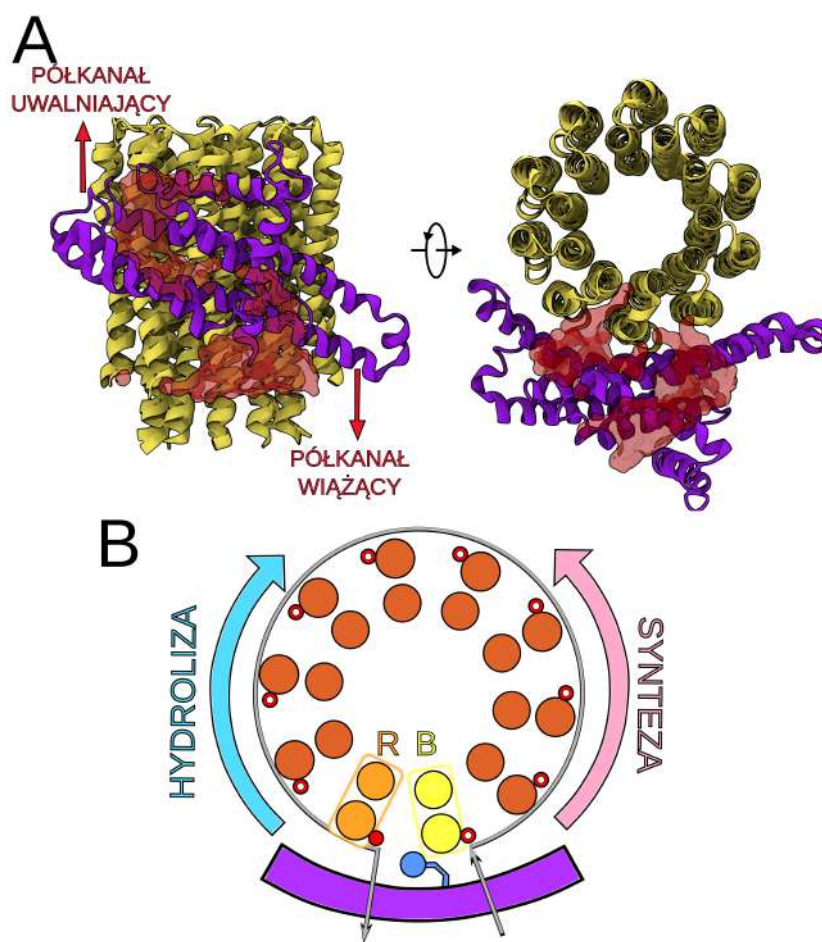
1.1.3 Mechanizm rotacji w obrębie kompleksu F_o

Ze uwagi na fakt, że niniejsza praca dotyczy mechanizmu działania i inhibicji kompleksu F_o syntazy ATP, rotacyjny mechanizm tego białka zostanie omówiony szczegółowo poniżej.

Siłą napędową rotacji c -pierścienia w kompleksie F_o jest gradient elektrochemiczny, który obejmuje różnicę pH (~ 1) oraz spadek potencjału elektrostatycznego (ok. 150 mV) w poprzek błony [50, 51]. Jak już to zostało wspomniane, gradient protonowy jest generowany i utrzymywany na relatywnie stałym poziomie przez łańcuch oddechowy. Stała wartość gradientu powoduje, że tendencja powrotu protonów do macierzy mitochondrialnej jest niezmienna, dzięki czemu kompleks F_o poddany jest stałemu średniemu momentowi siły napędzającemu rotację c -pierścienia. Protony są przenoszone z przestrzeni perimitochondrialnej do macierzy mitochondrialnej, co jest związane z rotacją c -pierścienia.

Droga protonu przez kompleks F_o rozpoczyna się w przestrzeni perimitochondrialnej, gdzie panuje wyższe stężenie protonów. Stamtąd proton wnika do półkanału wiążącego, utworzonego przez c -pierścień i podjednostkę a . Wewnątrz tego kanału cząsteczki wody tworzą uporządkowany łańcuch, który wspomaga transport protonu (np. na zasadzie mechanizmu Grotthussa). Następnie proton dociera do zakonserwowanej reszty kwasu glutaminowego (Glu59 w mitochondrialnej podjednostce c syntazy ATP z *Saccharomyces cerevisiae*), będącej elementem c -pierścienia w domenie F_o kompleksu znajdującego się w błonie wewnętrznej mitochondrium. Tam dochodzi do przejściowego związania protonu, czyli glutaminian ulega protonacji. Redukuje to jego polarny charakter i umożliwia dalszy obrót pierścienia, w trakcie którego sprotonowana reszta Glu59 przemieszcza się do hydrofobowego środowiska błony [52]. Sprotonowana podjednostka c obraca się wraz z całym c -pierścieniem, niosąc ze sobą proton aż do styku z półkanałem uwalniającym po drugiej stronie podjednostki a (obrót o niemal 360°). Kanał ten skierowany jest ku macierzy mitochondrialnej. Tam środowisko sprzyjające deprotonacji (niższe stężenie protonów i niższy potencjał elektrostatyczny) powoduje uwolnienie protonu z reszty kwasu glutaminowego do macierzy. W ten sposób cały proces zostaje domknięty, a energia uwalniana przy przemieszczeniu protonu w dół gradientu elektrochemicznego zostaje mechanicznie przekazana na obrót c -pierścienia [53, 5].

Proces przenoszenia protonu jest realizowany w kilku etapach i przedstawiono go na Rys. 5. Po stronie perimitochondrialnej cząsteczki wody dostają się do kluczowej reszty kwasu glutaminowego (rzadziej asparaginowego) poprzez półkanał wiążący na interfejsie c -pierścień/podjednostka a . Reszta ta (Glu59 w *Saccharomyces cerevisiae* [*S.c.*]; Glu65 w *Mycobacterium smegmatis* [*M.s.*]) znajduje się w połowie wysokości c -pierścienia. Środowisko półkanału wiążącego, umożliwiające wnikanie cząsteczek wody, jest tworzone przez polarne reszty aminokwasowe. Są nimi m.in. Glu223 i His185 (*S.c.* [55, 56] oraz Asp222 (*M.s.*) [57, 58, 59]). Ze względu na charakter tych reszt aminokwasowych oraz ich stopień zakonserwowania, spekulowano o ich roli w procesie przenoszenia protonów [31, 60, 61,



Rysunek 5: (A)Kompleks Fo z zaznaczonymi wodnymi półkanałami. (B) Schemat mechanizmu funkcjonowania kompleksu F_o. Rysunek na podstawie [54]

62, 55]. Ich obecność jest jednak kluczowa dla hydratacji półkanału. Dotychczasowe badania pokazały, że nieobecność grupy karboksylowej w półkanale wiążącym (Glu233 w *S.c*, Asp222 w *M.s*) skutkuje utratą dostępu wody do kluczowego glutaminianu c-pierścienia odpowiedzialnego za przenoszenie protonu [63, 60].

Protony, docierając przez środowisko wodne półkanału wiążącego do c-pierścienia, powodują protonację kluczowej reszty kwaśnej. Po sprotonowaniu, jak to zostało pokazane na Rys. 5, c-pierścień wykonuje obrót o jedną podjednostkę *c* w kierunku syntezy, czyli przeciwnie do ruchu wskazówek zegara (patrząc od strony macierzy mitochondrialnej), umieszczając w półkanale kolejną poprzednio zdeprotonowaną resztę kwaśną. W kolejnych takich krokach, po obrocie o niemal 360° sprotonowany kwas glutaminowy wchodzi do półkanału uwalniającego, zwróconego w kierunku macierzy mitochondrialnej. Hydratację tego półkanału zapewniają reszty polarne, w szczególności Asp244 i Glu162 (*S.c.*) [60, 61, 62] lub Gln243 i Glu178 (*M.s.*) [57, 58, 59]). Podobnie jak w przypadku półkanału wiążącego, utrata polarności skutkowałaby znacznym spadkiem uwodnienia tego półkanału. Jednak dzięki zakonserwowaniu tych reszt i obecności wody w półkanale uwalniającym,

kwask glutaminowy może ulec deportonacji, a proton przeniesiony na cząsteczkę wody finalnie trafia do macierzy mitochondrialnej.

Oczywiście opisany proces dotyczy pełnego obrotu c -pierścienia i wiąże się z wielokrotnie powtarzanymi procesami protonacji i deprotonacji. Zjawiska te zachodzą ściśle zsynchronizowane z obrotem c -pierścienia o jedną podjednostkę. Liczba tych kroków zależy od liczby podjednostek c -pierścienia. Efektem tego procesu jest powiązanie przepływu protonów przez kompleks F_o z obrotem c -pierścienia, a następnie kolejnych elementów syntazy ATP. [50, 52].

Z uwagi na symetrię c -pierścienia powstaje jednak pytanie, w jaki sposób kompleks F_o zapewnia jednokierunkowość ruchu c -pierścienia. Taka właściwość jest kluczowa dla zapobieżenia przeciekaniu protonów, czyli sytuacji, w której ich przepływ przestaje być sprzężony z globalnym ruchem rotacyjnym. Brak preferencji kierunkowej c -pierścienia prowadziłby do dyssypacji energii zgromadzonej w gradiencie protonowym w formie ciepła. Wysoka preferencja jest z kolei niezbędna dla utrzymania wysokiej wydajności procesu konwersji energii w obrębie syntazy ATP. Ponieważ obrót c -pierścienia o jedną podjednostkę w obu kierunkach skutkuje powstaniem stanów równoważnych, kierunek syntezy musi być preferowany kinetycznie, co oznacza, że bariera energetyczna wzdłuż współrzędnej obrotu powinna być znacznie niższa w kierunku syntezy niż w kierunku hydrolizy. Dotychczasowe badania sugerują, że ta preferencja jest wynikiem specyficznych interakcji między centralną resztą argininy w podjednostce a (Arg176 w *S.c*, Arg188 w *M.s*), a grupami karboksylowymi w półkanałach wiążącym i uwalniającym [64, 65, 52, 66]. Badania mutacji reszty argininy potwierdziły, że jej obecność jest warunkiem koniecznym dla sprzężenia translokacji protonów z ruchem mechanicznym związanym z obrotem c -pierścienia i zapobiegania przeciekaniu protonów [67, 68, 69].

Dodatkowo, ponieważ reszta argininy znajduje się dokładnie w centrum helisy podjednostki a , na styku z c -pierścieniem, pomiędzy dwoma półkanałami transportującymi protony, jej dodatni ładunek elektrostatyczny może oddziaływać z ujemnie naładowaną zdeprotonowaną grupą karboksylową jednej z podjednostek c znajdującej się w półkanałach wyjściowym. Oddziaływanie to sprzyjałoby rotacji c -pierścienia w kierunku syntezy ATP, przeciwdziałając jednocześnie ruchowi wstecznemu, czyli rotacji w kierunku hydrolizy [69, 70, 71]. @article PMID:19362069, @article PMID:19362069, Na tej podstawie zaproponowano różne modele mechanizmu kierunkowości obrotu, w tym model elektrostatyczny oparty na gruboziarnistych symulacjach komputerowych [65]. Mimo to, szczegóły tego procesu na poziomie atomowym pozostają wciąż nie w pełni poznane. W szczególności nie jest jasne, dlaczego ta konkretna reszta – arginina – jest tak silnie zakonserwowana ewolucyjnie. Co więcej, próby zastąpienia jej inną dodatnio naładowaną resztą, taką jak lizyna, która teoretycznie mogłaby pełnić podobną funkcję elektrostatyczną, nie przynoszą oczekiwanych efektów funkcjonalnych, takich jak utrzymanie efektywnej rotacji pierście-

nia i w efekcie syntezy ATP [72]. Sugeruje to, że oprócz samego ładunku, istotne mogą być również szczególne właściwości strukturalne i chemiczne argininy, które są kluczowe dla prawidłowego działania mechanizmu rotacyjnego.

Warto zwrócić uwagę na dwie amidowe reszty (w helisie 5, Asn180 dla *S.c*, Asn201 dla *M.s* oraz w helisie 6, Gln230 dla *S.c*, Gln289 dla *M.s*). Ich lokalizacja oraz wysoki stopień zakonserwowania wskazują na potencjalne znaczenie strukturalne lub funkcjonalne w stabilizacji środowiska hydrofilowego lub w organizacji półkanałów kompleksu F_o [57, 58, 59].

Na przestrzeni lat zaproponowano kilka szczegółowych mechanizmów działania kompleksu F_o . Jednym z nich jest tzw. model „kół w kołach”. Zakładał on, że przejście grupy karboksylowej z formy sprotonowanej do zdeprotonowanej wymaga obrotu helisy, do której ta grupa należy, o 180° . Przejście to miało być wspomagane przez silne oddziaływanie z usztywnioną resztą Arg, która przesuwana się względem grupy karboksylowej przy obrocie podjednostki a o 60° . W tym modelu rotacji ulega nie tylko c -pierścień, ale również zewnętrzna helisa podjednostki c , która obraca się na interfejsie a/c -pierścień w połączeniu z obrotem całej podjednostki a [73, 61, 74, 75]. Podstawą tego modelu była struktura kompleksu F_o uzyskana z wykorzystaniem spektroskopii NMR. Struktura ta obejmowała jedynie fragmenty białek tworzących kompleks, co skutkowało niepełnym i błędnym obrazem architektury domen transbłonowych. W konsekwencji orientacja helisy podjednostki a względem c -pierścienia została błędnie określona jako horyzontalna.

Późniejsze badania przeprowadzone z użyciem krioelektronowej mikroskopii (ang. *cryo-EM*) na kompletnych i funkcjonalnych kompleksach wykazały, że helisy podjednostki a są w rzeczywistości ułożone wertykalnie względem c -pierścienia, przecinając błonę prostopadłe, a nie równoległe, jak wcześniej sądzono. Oznacza to, że cała koncepcja modelu „kół w kołach” była oparta na błędnych założeniach strukturalnych wynikających z ograniczeń techniki NMR oraz braku kompletnego obrazu kompleksu [50, ?]

Innym proponowanym mechanizmem funkcjonowania kompleksu F_o był model „zębatki ruchów Browna” (ang. *brownian ratchet*) [52]. Jego zasada działania opierała się o trzy kluczowe założenia. Po pierwsze, zakłada się istnienie ograniczenia elektrostatycznego: grupy karboksylowe reszt (najczęściej Glu lub Asp) w podjednostkach c są zawsze sprotonowane, gdy są zwrócone w stronę lipidowego środowiska błony, natomiast mogą zostać zdeprotonowane, a więc naładowane ujemnie, gdy znajdują się w pobliżu podjednostki a , gdzie dostępne są półkanały protonowe. Po drugie, asymetryczne rozmieszczenie dwóch półkanałów protonowych w podjednostce a , które wchodzi w kontakt z protonami po przeciwnych stronach błony (cytoplazmatycznej i macierzowej), nadaje kompleksowi kierunkowość. Taka geometria sprawia, że rotacja c -pierścienia w jednym kierunku umożliwia kolejno sprotonowanie i zdeprotonowanie reszt karboksylowych, natomiast rotacja w przeciwnym kierunku jest energetycznie mniej korzystna. Po trzecie, model zakłada, że

pod wpływem nieukierunkowanych ruchów Browna *c*-pierścieni ulega spontanicznym, rotacyjnym fluktuacjom względem nieruchomej podjednostki *a*. Te przypadkowe ruchy są modulowane przez istniejący gradient protonowy, czyli asymetryczne środowisko elektrochemiczne błony – różnicę stężenia protonów i potencjału elektrycznego po obu jej stronach. Jeśli obrót pierścienia w jedną stronę ułatwia przepływ protonów zgodnie z tym gradientem, taki kierunek rotacji staje się energetycznie uprzywilejowany. W efekcie przypadkowe fluktuacje są „prostowane” przez system – tak jak w klasycznej zębatce Brownowskiej – i przekształcane w ruch kierunkowy. Choć model ten dobrze tłumaczył możliwość rotacji bez potrzeby istnienia klasycznego mechanizmu „zapadkowego”, jego zgodność z wysoką wydajnością energetyczną syntazy ATP została zakwestionowana. Ze względu na niemal 100% sprzężenie między transportem protonów a rotacją (a tym samym z syntezą ATP), wydaje się mało prawdopodobne, aby losowe fluktuacje termiczne były wystarczające do zapewnienia tak precyzyjnego i wydajnego działania. Dodatkowo, bardziej zaawansowane modele mechanochemiczne wspierane przez dane strukturalne uzyskane za pomocą mikroskopii krioelektronowej sugerują istnienie bardziej złożonych interakcji elektrostatycznych i mechanicznych niż przewidywał model „zębatki ruchów Browna”.

Wszystkie dotychczasowe modele napotykały na ten sam problem - zwykle brakowało wystarczających dowodów potwierdzających te hipotezy. Coraz więcej danych wskazuje, że mechanizm działa w oparciu o dwa półkanały tworzone na interfejsie podjednostek *a/c*, które są odseparowane od siebie za pomocą reszty Arg. Kanały tworzą środowiska wodne sprzyjające protonowaniu i deprotonowaniu reszty Glu.

1.1.4 Transfer protonu jako podstawowy proces

Jednym z kluczowych elementów mechanizmu działania kompleksu F_o , który nie został dotąd szczegółowo opisany, jest proces transportu protonów z *i* do *c*-pierścienia. Brak wiarygodnych danych termodynamicznych i kinetycznych dla tego procesu wynika z dwóch powodów. Po pierwsze, na poziomie eksperymentalnym bezpośredni pomiar przepływu protonów przez kompleks F_o w jego naturalnym środowisku błonowym jest wyjątkowo trudny. Związane jest to zarówno z ograniczoną dostępnością wysokorozdzielczych struktur w stanie aktywnym, jak i z technicznymi trudnościami w odtworzeniu elektrochemicznych warunków fizjologicznych *in vitro*. Po drugie, w podejściu obliczeniowym, atomistyczne symulacje komputerowe nie są obecnie w stanie wiarygodnie odwzorować ruchu pojedynczych protonów w tak złożonym układzie. Wynika to z faktu, że transport protonów często zachodzi przez tzw. mechanizm skokowy Grotthussa, oparty na dynamicznych reorganizacjach wiązań wodorowych w sieciach cząsteczek wody i reszt aminokwasowych. Oznacza to, że wiązania są wielokrotnie zrywane i odtwarzane, co z kolei wymaga uwzględnienia efektów kwantowych i czasów symulacji wykraczających poza możliwości konwencjonalnej dynamiki molekularnej *ab initio*. Rozwiązaniem może być

zastosowanie uproszczonego kwantowego opisu zachowania protonów, który zostanie szerzej wyjaśniony w rozdziale Metody. Dodatkowym ograniczeniem jest brak wystarczająco precyzyjnie opracowanych pól sił — czyli zestawów parametrów opisujących oddziaływania między atomami w symulacjach molekularnych — oraz odpowiadających im modeli dla reszt w stanie protonowanym i zdeprotonowanym w warunkach hydrofobowego wnętrza błony. Innymi słowy, obecne narzędzia obliczeniowe nie odwzorowują w pełni, jak takie układy zachowują się w tego rodzaju środowisku, co utrudnia realistyczne symulacje. Biorąc pod uwagę, że wypadkowy proces katalityczny realizowany przez syntazę ATP, a zatem także transport protonów przez błonę, zachodzi w czasie rzędu milisekund, bezpośrednie odwzorowanie ruchu protonów oznaczałoby konieczność prowadzenia długotrwałych symulacji, generujących obecnie nieosiągalne koszty obliczeniowe. Warto dodać, że precyzyjne zbadanie transportu protonów wymaga uwzględnienia całego kompleksu F_o , ponieważ dynamika przenoszenia ładunków zależy nie tylko od lokalnych właściwości kanałów protonowych w podjednostce a , takich jak konformacja czy wzajemne ułożenie łańcuchów aminokwasowych, ale także od konformacyjnych zmian całego białka. Ważne są zwłaszcza oddziaływania pomiędzy c -pierścieniem a podjednostką a , które determinują m.in. kąt obrotu c -pierścienia, przy którym dochodzi do protonowania reszty kwaśnej w półkanale wiążącym oraz deprotonowania tej reszty w półkanale uwalniającym. Pominiecie któregośkolwiek z tych elementów prowadziłoby do istotnego zafałszowania wyników, ponieważ transport protonów jest procesem ściśle skorelowanym z ruchem obrotowym i zmianami środowiska elektrostatycznego w obrębie całego układu rotacyjnego.

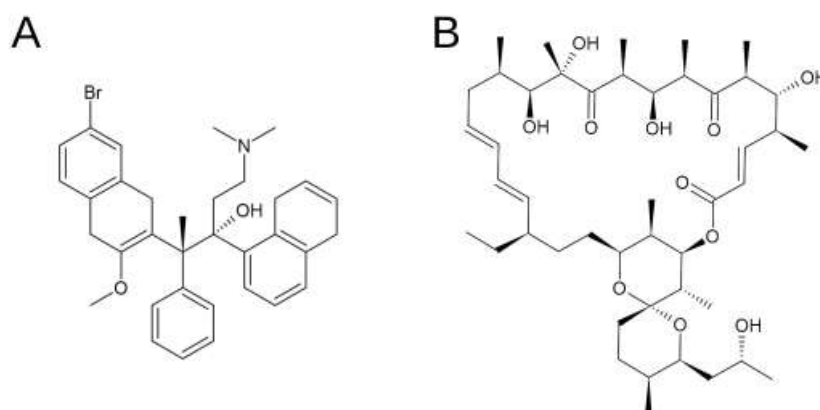
Znaczącą rolę w mechanizmie działania kompleksu F_o odgrywa także konformacja grupy karboksylowej podjednostek c -pierścienia. Grupa ta może przyjmować konformację otwartą, charakterystyczną dla stanu zdeprotonowanego, lub zamkniętą, występującą w przypadku sprotonowanego aminokwasu. Na stabilność tych konformacji istotny wpływ ma stopień uwodnienia lokalnego środowiska. W hydrofobowym wnętrzu błony, preferowaną konformacją dla sprotonowanej reszty glutaminianowej (Glu) jest forma zamknięta, stabilizowana przez wewnętrzne wiązania wodorowe między grupą karboksylową a sąsiednimi resztami w obrębie c -pierścienia. Z kolei w silnie uwodnionym otoczeniu półkanałów, gdzie dominują oddziaływania z cząsteczkami wody, formy zdeprotonowane przyjmują głównie konformację otwartą. Sprotonowane grupy karboksylowe w środowisku uwodnionym mogą występować w obu stanach, choć z niewielką przewagą konformacji zamkniętej [71].

1.2 Inhibitory syntazy ATP

Ze względu na kluczową rolę syntazy ATP, jaką jest sprzęgnięcie procesów katabolicznych z anabolicznymi poprzez syntezę ATP, enzym ten stanowi interesujący cel molekularny w projektowaniu leków. Jednym z eksploatowanych podejść terapeutycznych jest upo-

śledzenie procesu translokacji protonów przez kompleks F_o , co skutkuje zahamowaniem produkcji ATP. W tym mechanizmie, w przeciwieństwie do działania inhibitorów łańcucha oddechowego, transport elektronów i wytwarzanie gradientu protonowego mogą przebiegać nadal, jednak zmagazynowana energia nie jest wykorzystywana do syntezy ATP — przykładem takiego inhibitora jest bedakilina (Bq) stosowana w leczeniu gruźlicy [76]. W kontekście chorób bakteryjnych syntaza ATP jawi się jako atrakcyjny cel terapeutyczny. Jednak wysoki stopień konserwacji strukturalnej tego enzymu pomiędzy organizmami prokariotycznymi a eukariotycznymi powoduje, że opracowanie inhibitorów o wystarczającej selektywności pozostaje istotnym wyzwaniem badawczym. Podobne wyzwania dotyczą prób wykorzystania syntazy ATP jako celu w leczeniu chorób wywoływanych przez eukariotyczne mikroorganizmy, np. w terapii zakażeń grzybiczych [77]. Niezależnie od zastosowań w leczeniu chorób zakaźnych, rosnące zainteresowanie syntazą ATP dotyczy także jej potencjalnej roli w terapii schorzeń niezakaźnych, w których enzym ten może działać jako regulator metabolizmu komórkowego — na przykład w wybranych typach nowotworów czy zaburzeniach neurodegeneracyjnych [77].

Dotychczas opisano kilka klas inhibitorów oddziałujących z kompleksem F_o , przedstawionych na Rys. 6. Należą do nich m.in. bedakilina (ang. *Bedaquiline*, Bq, 1-(6-bromo-2-metoksychinolin-3-ylo)-4-(dimetyloamino)-2-(naftaleno-1-ylo)-1-fenylobutan-2-ol), lek przeciwgruźliczy oraz oligomycyna (ang. *Oligomycin*, Olg), inhibitor mitochondrialnej syntazy ATP. Zakłada się, że mechanizm działania obu tych związków jest podobny, na co wskazuje ich zdolność do wiązania się z powierzchnią *c*-pierścienia w okolicy kluczowej reszty kwasnej odpowiedzialnej za transport protonów [78].



Rysunek 6: Wzory strukturalne inhibitorów błonowego kompleksu F_o .

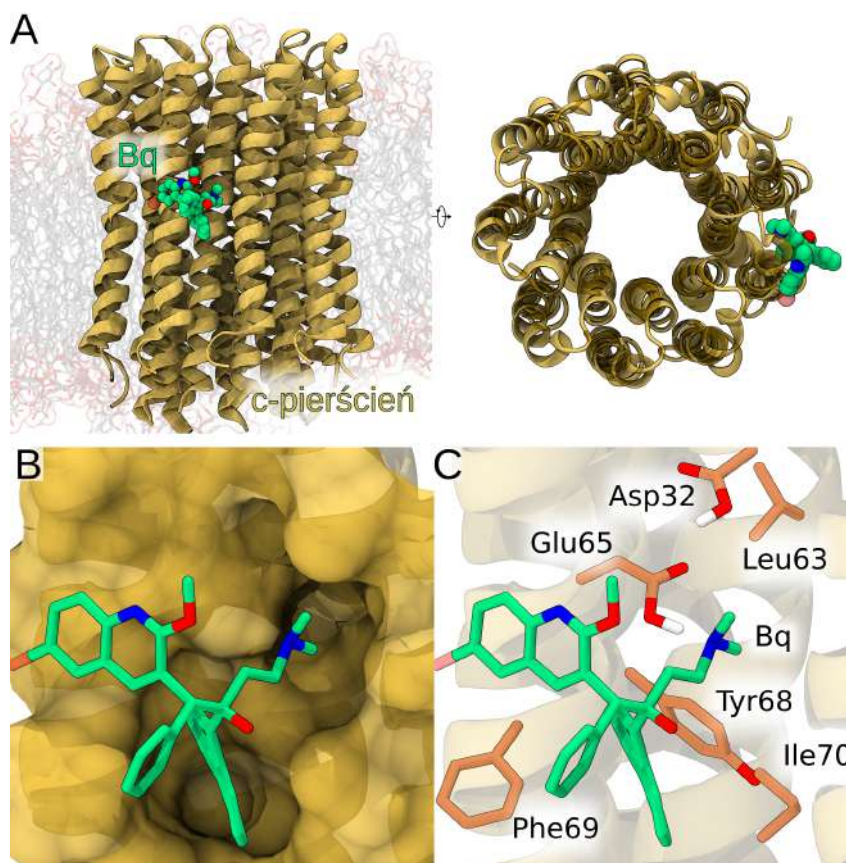
1.2.1 Bedakilina – lek przeciwgruźliczy

Bedakilina jest związkiem z grupy diarylocholin, otrzymanym w 2005 roku na podstawie testów fenotypowych jako inhibitor przeciwko *Mycobacterium smegmatis* (*M.s.*) [76]. W 2012 roku została zatwierdzona przez Agencję Żywności i Leków w Stanach Zjednoczonych

jako lek w przypadkach wielo- i wysoko-lekoopornej gruźlicy płuc (ang. *multidrug-resistant tuberculosis*, MDR-TB; *extensively drug-resistant tuberculosis*, XDR-TB) [76, 79]. Znalazła się też na wzorcowej liście leków podstawowych Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *WHO Model Lists of Essential Medicines*) [80], a od 2019 roku jest także dopuszczona do stosowania w Polsce. Wykazuje aktywność wobec niereplikujących prądków gruźlicy oraz ma potencjał do skrócenia czasu terapii [81, 82].

Dotychczasowe badania wskazują, że Bq jest związkiem selektywnie hamującym działanie mykobakteryjnej syntazy ATP [58]. Molekularny mechanizm tego działania nie jest jednak w pełni poznany. Struktury krystaliczne kompleksu Bq z *c*-pierścieniem (PDB: 4V1F) [21] a następnie z pełnym białkiem Fo (PDB: 7JGC) [83] pozwoliły na zidentyfikowanie i charakterystykę miejsca wiążącego Bq w obrębie syntazy ATP. Jak się okazało, lek wiąże się na powierzchni zewnętrznych helis *c*-pierścienia, gdzie tworzy się płytką kieszeń wiążąca. Pierwsze struktury krystaliczne kompleksu z Bq były niewystarczające w kontekście badania hipotez mechanizmu jego działania. Zawierały bowiem wyłącznie *c*-pierścień wraz ze związkiem, co utrudnia badanie, czy i w jaki sposób Bq hamuje ruch *c*-pierścienia względem podjednostki *a*. Dopiero niedawne rozwiązanie pełnego kompleksu F_o z Bq umożliwiło prowadzenie analiz w zakresie zrozumienia mechanizmu inhibicji syntazy ATP przy pomocy Bq.

Bq jest słabą, hydrofobową zasadą o pewnych właściwościach amfifilowych (pK_a = 8.9, logP = 7.25[84]) z dwoma sąsiadującymi centrami chiralnymi (Rys. 6. Charakteryzuje się stosunkowo długim farmakokinetycznym okresem półtrwania, co zwiększa jej toksyczność. Badania nad modyfikacjami Bq doprowadziły do wniosków, że aktywność przeciwgruźlicza w grupie pochodnych Bq silnie zależy od ich lipofilowości [84]. Ponadto wykazano, że Bq jest związkiem o relatywnie wysokim powinowactwie i selektywności względem swojego celu komórkowego u mykobakterii, co sprawia, że wykazuje niską aktywność wobec innych bakteryjnych homologów białka Fo [85]. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy do stworzenia kompleksu Bq z *c*-pierścieniem w miejscu wiążącym niezbędna jest obecność fragmentu diarylochinolinowego oraz grupy dimetyloaminowej. Badania *in vitro* pokazały, że modyfikacje w obrębie grup fenyłowej, naftyłowej, hydroksylowej oraz substytucja atomu bromu nie mają istotnego wpływu na aktywność przeciwbakteryjną [86, 84, 85, 87, 88, 89]. Wiązanie Bq z mykobakteryjnym białkiem F_o wymusza pewne zmiany konformacyjne w białku, obejmujące zwłaszcza rotację łańcucha bocznego fenyloalaniny (Phe69), która następuje w celu uniknięcia sterycznego nakładania z grupą hydroksylową Bq [21]. Takie dostosowanie kieszeni wiążącej do Bq odpowiada modelowi indukowanego dopasowania – jednemu z dwóch najpowszechniejszych dyskutowanych mechanizmów tworzenia kompleksów białko-inhibitor [83]. Warto zwrócić uwagę, że niemal wszystkie reszty aminokwasowe tworzące kieszeń wiążącą Bq mają charakter hydrofobowy, więc kontakty między Bq i *c*-pierścieniem są w większości niepolarne i stabilizują kompleks za pośrednictwem oddziaływań van der



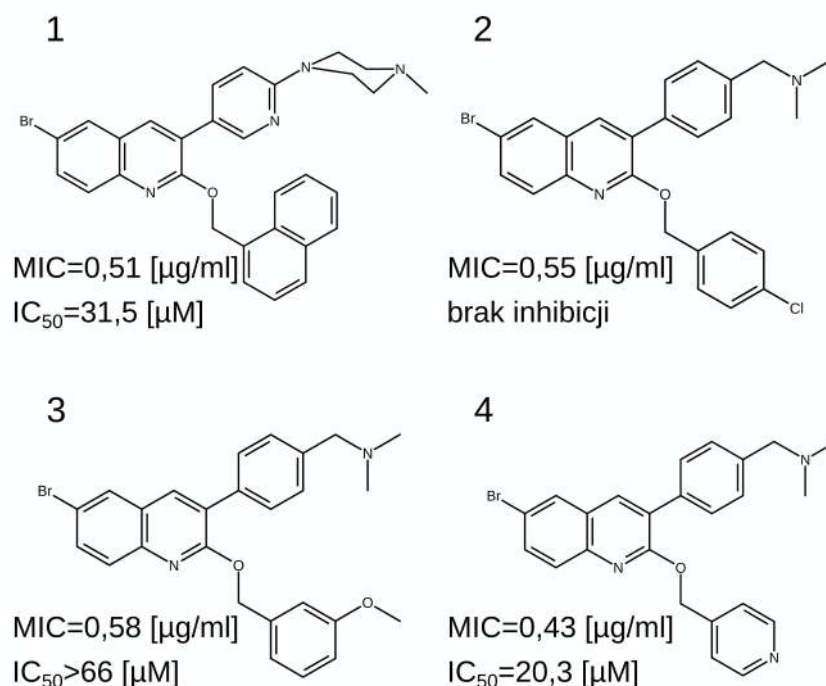
Rysunek 7: Struktura kompleksu F_o ze związaną bedakiliną (PDB: 7JGC) [83]. (A) Struktura mykobakteryjnego c-pierścienia ze związaną Bq; widok z boku oraz z góry. (B) Dopasowanie przestrzenne cząsteczki Bq do miejsca wiążącego. (C) Miejsce wiążące z zaznaczeniem najbardziej kluczowych reszt aminokwasowych dla tworzenia kompleksu.

Waalsa [59, 83]. Ze względu na to, że oddziaływanie F_o -Bq ma miejsce w hydrofobowym środowisku błony, niepolarne kontakty nie mogą się w pełni tłumaczyć energii swobodnej wiązania w tym kompleksie, wynoszącej ok. -8 kcal/mol [90, 91]. Istotnym wkładem do siły napędowej procesu wiązania Bq musi być zatem jedyny kontakt polarny, czyli wiązanie wodorowe między grupą aminową leku a zakonserwowanym, kluczowym glutaminianem c-pierścienia, który w przypadku *Mycobacterium tuberculosis*, (*M.t.*) znajduje się w pozycji 65. Wiele wskazuje na to, że komplementarność kształtu leku i białka jedynie stwarza steryczne warunki do powstania tego oddziaływania. Ilościową analizą istotności tego wiązania wodorowego dla specyficzności i powinowactwa Bq do białka F_o zajęłam się w niniejszej pracy.

Pochodne bedakiliny

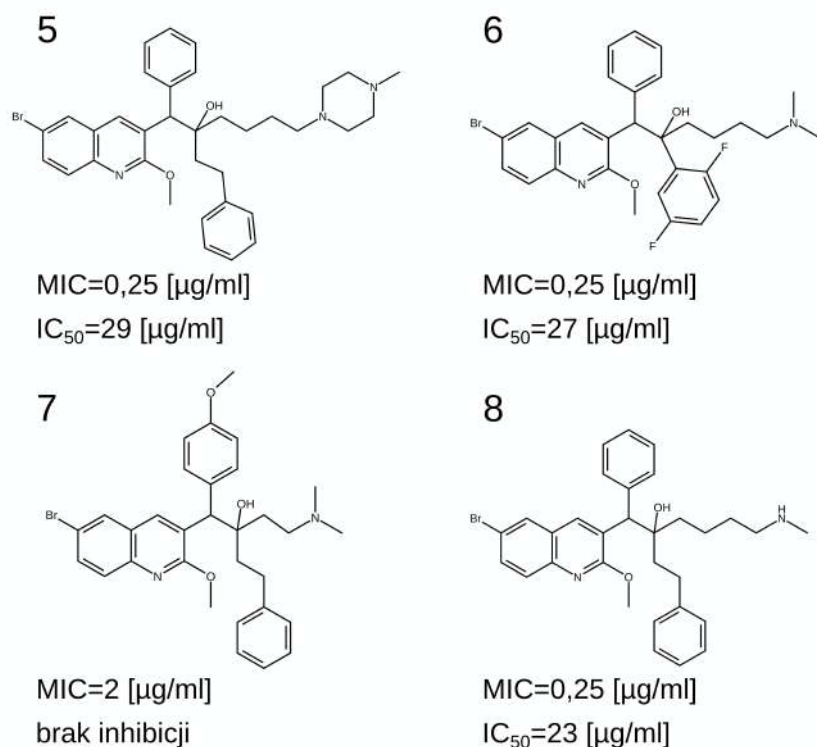
Zauważając właściwości i potencjał terapeutyczny bedakliny, zaczęto poszukiwać pochodnych, które wykazywałyby rozszerzone lub zmienione spektrum przeciwdrobnoustrojowe [76, 87]. Biorąc pod uwagę samą strukturę Bq, należy pamiętać, że posiada ona dwa

sąsiadujące centra chiralne (Rys. 6), co sprawia, że jej synteza chemiczna jest procesem pracochłonnym i kosztownym [92, 93]. Kolejnym argumentem za poszukiwaniem pochodnych Bq o poprawionych parametrach terapeutycznych i chemicznych był fakt, że związek ten ze względu na swoją lipofilowość może się nadmiernie kumulować w tkankach [94]. W ramach tych prac związanych z optymalizacją pochodnych Bq, przeprowadzono systematyczne badania zależności między strukturą a aktywnością biologiczną (ang. *structure-activity relationship*, SAR)[95, 87, 86]. Analizy te miały na celu identyfikację kluczowych elementów strukturalnych odpowiedzialnych za aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz poprawę właściwości farmakokinetycznych i toksykologicznych. Zastosowano również narzędzia komputerowego wspomaganie projektowania leków (ang. *computer-aided drug design*, CADD)[88], umożliwiające modelowanie oddziaływań ligand-białko, ocenę właściwości fizykochemicznych oraz predykcję potencjalnych miejsc wiązania. Wszystkie badania prowadzono z wykorzystaniem wspólnego rdzenia diarylochinolinowego, modyfikując różne podstawnikowe pozycje w celu zwiększenia powinowactwa do docelowego miejsca działania – głównie *c*-pierścienia pochodzącego z *Mycobacterium tuberculosis* – oraz minimalizacji efektów ubocznych. Dzięki tym podejściom udało się wyselekcjonować związki o zwiększonej aktywności biologicznej, stanowiące podstawę dalszych badań przedklinicznych.



Rysunek 8: Wzory strukturalne zaproponowanych modyfikacji Bq, wraz z odpowiadającymi im wartościami MIC (dla inhibicji syntazy ATP w odwróconych pęcherzykach błonowych *Mycobacterium phlei*) oraz wartościami IC₅₀ [86]

Na podstawie tych badań zasugerowano, że grupa naftylowa może zostać zastąpiona



Rysunek 9: Potencjalne modyfikacje cząsteczki Bq o potencjale inhibicji bakterii Gram-dodatnich *Streptococcus pneumoniae* wraz z wartościami MIC oraz IC₅₀ [87]

proszym pierścieniem benzenowym, natomiast grupa metoksyłowa — różnymi heterocyklicznymi pierścieniami aromatycznymi, takimi jak pirydyna, tiofen czy furany, zawierającymi różnorodne podstawniki, które mogłyby modyfikować właściwości fizykochemiczne i biologiczne związku [87, 86]. Wykazano również, że obecność atomu azotu w pierścieniu chinolinowym nie wpływa istotnie na aktywność biologiczną. Oznacza to, że modyfikacje w pozycji odpowiadającej pierwotnemu atomowi bromu mogą być prowadzone swobodniej, bez ryzyka znaczącego obniżenia aktywności [89, 88]. Wybrane struktury potencjalnie aktywnych pochodnych bedakiliny zaprezentowałam na rysunku 31. Dla części z nich przeprowadzono badania aktywności biologicznej, mierząc minimalne stężenie hamujące (ang. *minimum inhibitory concentration*, MIC) czyli najniższe stężenie związku hamujące wzrost drobnoustrojów oraz połowiczne stężenie hamujące (*half-maximal inhibitory concentration*, IC₅₀), które określa stężenie substancji powodujące 50% spadek aktywności enzymu, w tym przypadku syntazy ATP. Parametry MIC mierzono z wykorzystaniem odwróconych pęcherzyków błonowych zawierających syntazę ATP pochodzącą z *Mycobacterium phlei*, natomiast wartości IC₅₀ uzyskiwano na podstawie analizy aktywności enzymatycznej syntazy ATP w obecności testowanych związków w różnych stężeniach. Na podstawie tych parametrów nie zidentyfikowano jednak żadnego związku, który mógłby stanowić bardziej atrakcyjny terapeutyk, w porównaniu do Bq. Może to więc sugerować, że poszukiwania aktywnych pochodnych zostały oparte o elementy strukturalne,

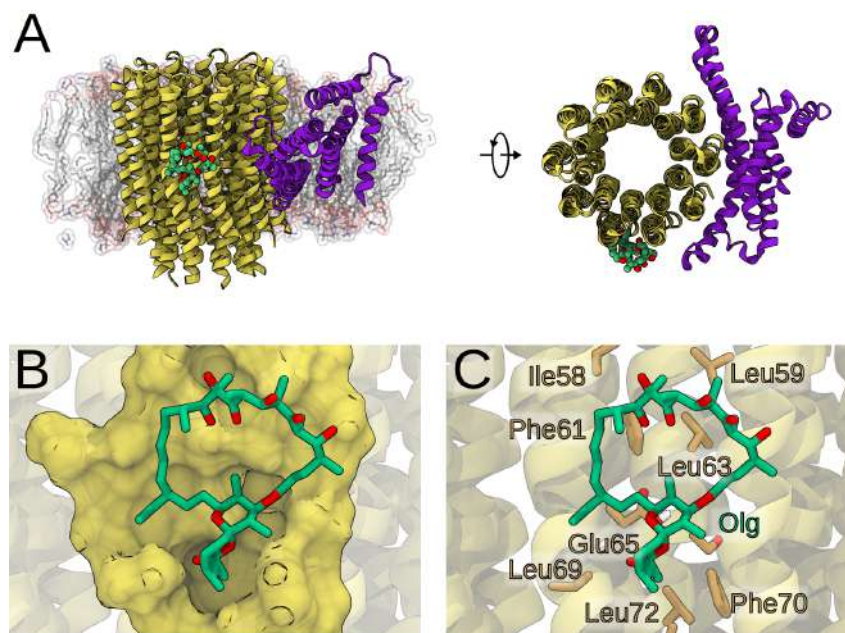
które nie determinują aktywności przeciwbakteryjnej. Jednocześnie fakt ten wskazuje, że oddziaływania, które z białkiem tworzą ugrupowania Bq: grupa naftyłowa, fenyłowa czy metoksyłowa, nie są kluczowe dla procesu wiązania. Powstaje więc pytanie czy są potencjalne możliwości modyfikacji cząsteczki Bq, które mogłyby prowadzić do zmiany lub rozszerzenia spektrum działania związku. Należy zauważyć, że żadne z badanych modyfikacji nie obejmowały grupy dimetyloaminowej, tworzącej wiązanie wodorowe z *c*-pierścieniem. W niniejszej pracy zbadalam rolę tego ugrupowania dla aktywności i selektywności Bq, wskazując na nowe możliwości modyfikowania struktury cząsteczki.

1.2.2 Oligomycyna – inhibitor mitochondrialnej syntazy ATP

Po raz pierwszy wrażliwość mitochondrialnego *c*-pierścienia syntazy ATP na oligomycynę zidentyfikowano w 1958 roku, wykazując jednocześnie jej niższą aktywność przeciwko bakteryjnym homologom [96]. Przez kolejne dekady, mimo intensywnych badań, nie udało się jednoznacznie określić miejsca wiązania tego inhibitora. Główną przeszkodą były trudności w uzyskaniu wysokorozdzielczych struktur kompleksów błonowych F_o , wynikające z ich hydrofobowego charakteru i niestabilności poza środowiskiem błonowym. Przełom nastąpił wraz z rozwojem metod krystalografii rentgenowskiej i mikroskopii krioelektronowej (*cryo-EM*), które umożliwiły uzyskanie struktur związków w kompleksie z ich docelowymi białkami.

W 2012 roku opublikowano pierwszą strukturę kompleksu oligomycyny z izolowanym *c*-pierścieniem (PDB: 4F4S [97]), a w 2018 roku — strukturę całego mitochondrialnego kompleksu F_o w obecności oligomycyny, uzyskaną techniką *cryo-EM* (PDB: 6CP5 [98]). Analiza tych struktur pozwoliła zidentyfikować miejsce wiązania oligomycyny — znajduje się ono w szczelinie między dwiema sąsiadującymi podjednostkami *c*-pierścienia, dokładniej między ich transbłonowymi helisami. Ta specyficzna lokalizacja wiązania, uwzględniająca unikalne cechy powierzchni kontaktowej mitochondrialnego *c*-pierścienia, tłumaczy wyższe powinowactwo i selektywność oligomycyny wobec mitochondrialnej syntazy ATP w porównaniu do homologów bakteryjnych [98].

Olg (oligomycyna) należy do grupy poliketydowych antybiotyków makrolidowych, których charakterystycznym elementem strukturalnym jest makrocycliczny pierścień laktonowy (Rys. 6) [57]. Struktura cząsteczki Olg obejmuje również pierścień ketalowy w wariancie spiro, typowe dla wielu naturalnych produktów biosyntetyzowanych przez szlaki poliketydowe. Zarówno część hydrofobowa, jak i hydrofilowa odgrywają istotną rolę w oddziaływaniu związku z kompleksem F_o . Dane krioelektronowe i krystalograficzne (Rys. 10) wskazują, że oligomycyna wiąże się w szczelinie między dwiema sąsiadującymi podjednostkami *c*-pierścienia, w rejonie ich transbłonowych helis [97, 98]. Hydrofobowa powierzchnia pierścienia laktonowego dopasowuje się do hydrofobowej kieszeni utworzonej przez niepolarne reszty boczne aminokwasów *c*-pierścienia, stabilizując położenie cząsteczki w obrębie



Rysunek 10: Struktura kompleksu F₀ ze związaną oligomycyną na podstawie PDB: 6CP5 [98]. (A) Struktura *c*-pierścienia ze związaną Olg; widok z boku oraz z góry. (B) Dopasowanie przestrzenne cząsteczki Olg do miejsca wiążącego. (C) Miejsce wiążące z zaznaczeniem reszt aminokwasowych kluczowych dla tworzenia kompleksu.

błony. Część hydrofilowa, zawierająca grupy hydroksylowe, jest skierowana w stronę wnętrza kieszeni, w pobliżu reszty Glu59 w drożdżowym wariantcie *c*-pierścienia, gdzie tworzy oddziaływania polarne — głównie poprzez pośrednie wiązania wodorowe z udziałem cząsteczek wody [97]. Zakłada się, że takie umiejscowienie cząsteczki blokuje krytyczne elementy rotora biorące udział w transporcie protonów przez kompleks F₀, co uniemożliwia rotację *c*-pierścienia i w konsekwencji zatrzymuje syntezę ATP w podjednostce F₁. Ze względu na swoją wysoką swoistość wobec mitochondrialnej syntazy ATP i dużą siłę hamowania, oligomycyna pozostaje cennym narzędziem badawczym w bioenergetyce, choć jej toksyczność wyklucza zastosowanie terapeutyczne.

1.2.3 Potencjalne mechanizmy działania inhibitorów

Pomimo znaczących różnic w budowie Bq i Olg, uwidocznionych przez ich wzory strukturalne na Rys. 6 (m.in. wielkość cząsteczki, elastyczność konformacyjna), obie cząsteczki charakteryzują się szeregiem podobnych właściwości, dzięki którym działają one jako inhibitory białka F₀ syntazy ATP. Oba związki łączy przede wszystkim to, że są inhibitorami działającymi w środowisku błony lipidowej, gdzie mogą wiązać się bezpośrednio z ekspozowaną powierzchnią białka. Preferencja do lokalizowania w błonie uwarunkowana jest tym, że obie cząsteczki są silnie hydrofobowe, charakteryzując się wartościami współczynnika podziału *logP* wynoszącymi 7.1 dla Olg i 7.2 dla Bq. Obie one jednak zawierają w swojej budowie także ugrupowania polarne, umożliwiające tworzenie wiązań z kluczową

grupą karboksylową reszty Glu *c*-pierścienia, uczestniczącą w transporcie protonów [86].

Zaproponowano kilka teorii opisujących mechanizm działania Bq jako inhibitora mykobakteryjnego kompleksu F_o . Jedna z nich opiera się na założeniu, że inhibitor – wiążąc się na powierzchni *c*-pierścienia – tworzy z nim ścisły kompleks i tym samym blokuje możliwość rotacji, działając jako zawada steryczna. Innymi słowy, taka klasa inhibitorów F_o działałaby na zasadzie klina wchodzącego pomiędzy podjednostkę *a* oraz *c*-pierścień. Uzyskane ostatnio struktury krioelektronowe pełnego mykobakteryjnego kompleksu F_o ze związaną Bq potwierdzają tę hipotezę [83]. Bez związanego inhibitora, zewnętrzna powierzchnia *c*-pierścienia jest relatywnie gładka, co sprzyja jej ruchowi rotacyjnemu względem nieruchomej podjednostki *a*, ciasno otaczającej *c*-pierścień. Odpowiednio silne związanie na powierzchni *c*-pierścienia cząsteczki takiej jak Bq czy Olg, skutkuje powstaniem wypukłości, która w kontakcie z podjednostką *a* powinna działać jako zewnętrzny element utrudniający rotację [98, 97, 99, 100, 83]. Hipoteza ta jednak dotychczas nie została bezpośrednio potwierdzona ani eksperymentalnie, ani w symulacjach komputerowych.

Inna teoria zakłada, że bedakilina może działać jak jonofor, transportując protony (oraz jony K^+) przez błonę komórkową [101]. Zdolność tej cząsteczki do przenoszenia jonów wynika z jej właściwości lipofilowych i zdolności do tworzenia kompleksów z protonami, które następnie mogą być przemieszczane w poprzek dwuwarstwy lipidowej. Tego rodzaju transport skutkuje (częściowym) zniesieniem gradientu potencjału elektrochemicznego protonów poprzez wyrównanie stężeń protonów po obu stronach błony, co skutkuje redukcją — lub całkowitym zanikiem — siły protonomotorycznej. Oznacza to, że energia niezbędna do napędzania mechanizmu obrotowego syntazy ATP (wynikająca z gradientu pomiędzy dwoma stronami błony) przestaje być dostępna. W konsekwencji dochodzi do zatrzymania syntezy ATP, co dla komórki bakteryjnej oznacza zahamowanie procesów energetycznych i w efekcie śmierć komórki [101]. Jednak mechanizm ten wydaje się być mało prawdopodobny ze względu na fakt, że Bq, działając jako wydajny jonofor, stanowiłaby potencjalnie silnie toksyczną cząsteczkę — zarówno dla patogenów, jak i dla komórek gospodarza. Działanie jonoforowe wiąże się z nieselektywnym zaburzeniem potencjału elektrochemicznego błon, co mogłoby prowadzić do poważnych zakłóceń w homeostazie komórkowej. Dodatkowo, choć cząsteczka Bq zawiera grupę aminową zdolną do wiązania protonu, brakuje w jej strukturze innych charakterystycznych cech typowych dla klasycznych jonoforów — takich jak uporządkowane układy donorów atomów tlenu czy pierścienie tworzące kanały jonowe. Brak takich elementów ogranicza możliwość selektywnego transportu kationów, a co za tym idzie — osłabia argumentację na rzecz mechanizmu jonoforowego. Co więcej, efektywne działanie jako jonofor wymagałoby nie tylko zdolności do wiązania, ale także do przenoszenia jonów przez błonę lipidową w sposób cykliczny, bez utraty integralności cząsteczki, czyli bez jej trwałego uszkodzenia, rozpadu chemicznego lub utknięcia po jednej stronie błony. Tylko wówczas mogłaby ona wielokrotnie powtarzać

proces transportu, co jest kluczowe dla funkcjonowania jonoforów w ujęciu klasycznym.

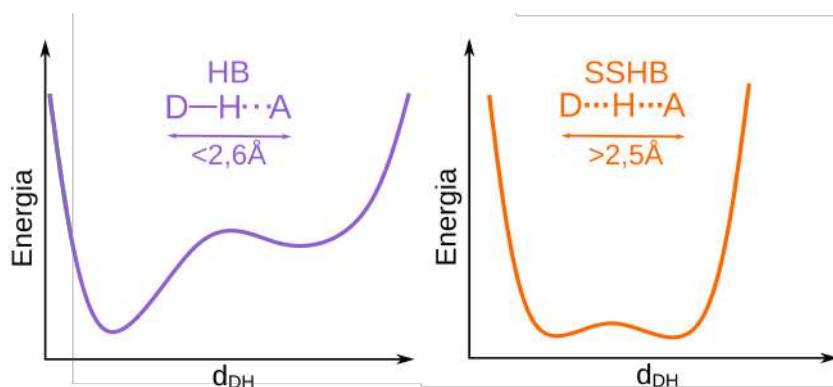
1.3 Wiązanie wodorowe i jego znaczenie dla mechanizmu inhibicji białka F_o

Jak zostało to omówione powyżej, istotnym elementem interakcji Bq i Olg z kompleksem F_o są wiązania wodorowe z resztą Glu zaangażowaną w transport protonów. W warunkach hydrofobowego środowiska błony, w którym funkcjonuje F_o , tego typu oddziaływania odgrywają szczególną rolę, co będzie istotne w dalszej analizie mechanizmu działania inhibitorów.

Wiązania wodorowe (ang. *hydrogen bonds*, HB) są wszechobecnymi oddziaływaniami międzycząsteczkowymi charakteryzującymi się kierunkowością i specyficznością. Ze względu na swoją wszechstronność i stabilność odgrywają fundamentalną rolę w przypadku wielu zjawisk fizycznych, od determinowania struktur i funkcji białek, przez rozpoznanie molekularne i samoorganizację, aż po reaktywność chemiczną [102, 103]. Pojęcie wiązania wodorowego zostało zaproponowane przez Paulinga, który zauważył, że w niektórych warunkach atom wodoru silnie wiąże się, nie do jednego, a do dwóch atomów. Dzieje się to w taki sposób, że można uznać, że działa jako element wiążący pomiędzy nimi [104]. Oba atomy, do których związany jest taki atom wodoru, muszą być jednak silnie elektroujemne. Siła wiązania wodoru (H) do jednego z tych atomów jest zwykle większa, przez co jest on określany jako donor wiązania wodorowego (D). Jego oddziaływanie z H ma charakter kowalencyjny. Z kolei atom związany słabiej z atomem wodoru staje się akceptorem wiązania wodorowego (A). Jego oddziaływanie z H ma głównie charakter elektrostatyczny i zwykle jest dużo słabsze niż typowe wiązanie kowalencyjne. Sam akceptor musi posiadać co najmniej jedną wolną parę elektronową, która oddziałuje z H. Tworzenie wiązania wodorowego wiąże się zatem z transferem elektronów z akceptora w kierunku układu donującego [105]. Ze względu na ten dwoisty aspekt oddziaływań wodoru z donorem i akceptorem wiązania wodorowe mają charakter zarówno kowalencyjny, jak i elektrostatyczny. Ponadto z perspektywy teoretycznej (np. schemat dekompozycji Morokumy i Kitaury) na energię oddziaływania wiązania wodorowego składają się: energia wymienna, E_{EX} (która wynika z odpychania Pauliego układów zamkniętopowłokowych) oraz składowe, będące wynikiem działania sił przyciągających: energia polaryzacji (E_{PL}), energia transferu ładunku (E_{CT}) i energia elektrostatyczna (E_{ES}) [106]. Zazwyczaj energia wiązania wodorowego waha się w zakresie 2–10 kcal/mol, dlatego HB są uznawane za słabe oddziaływania niekowalencyjne [107, 108]. Odległość pomiędzy donorem i akceptorem, d_{DA} , wynosi zazwyczaj $<3.0 \text{ \AA}$ przy lokalizacji protonu na donorze [109, 110], oraz jest mniejsza niż suma promieni van der Waalsa atomów D i A [111]. Odpowiada to silnie asymetrycznej zależności energii potencjalnej w funkcji położenia H wzdłuż osi wiązania.

Wówczas widoczne jest wyraźniejsze minimum przy małej odległości D-H [112], co prezentuje profil energetyczny na rysunku 11. Innym charakterystycznym efektem tworzenia wiązania wodorowego jest wydłużenie długości wiązania D-H w cząsteczce donorowej w porównaniu do stanu izolowanego. Towarzyszy temu przesunięcie częstotliwości antysymetrycznych modów drgań rozciągających wiązanie D-H w kierunku niższych energii (czyli w stronę podczerwieni), a także znaczący wzrost intensywności pasma w widmie IR [105]. Zjawisko to jest bezpośrednią konsekwencją osłabienia wiązania D-H na skutek jego oddziaływania z akceptorem A i stanowi jedno z kluczowych spektroskopowych kryteriów obecności i siły wiązania wodorowego. Jest więc to jedno z najważniejszych kryteriów wykrywania HB za pomocą metod spektroskopowych. Siła wiązania wodorowego jest zależna od jego długości, a zatem także odległości między D i A, oraz kąta D-H-A. Jednak ze względu na elektrostatyczny wkład do energii HB, niewielkie odchylenia od liniowości wiązania (do 20°) mają relatywnie słaby wpływ na jego siłę.

W tworzeniu stabilnych wiązań wodorowych dużą rolę odgrywa również środowisko. HB tworzone w wodzie są mniej stabilne (zatem efektywnie słabsze), bo cząsteczki wody konkurują z donorem i akceptorem, ponieważ same mogą tworzyć z nimi wiązanie wodorowe. W efekcie tego energia swobodna wiązania określająca jego wypadkową stabilność w danych warunkach będzie relatywnie niewielka, a tworzone wiązanie będzie dłuższe. Natomiast w przypadku braku silnych oddziaływań konkurencyjnych z rozpuszczalnikiem, HB tworzone w rozpuszczalnikach aprotycznych są silniejsze i na ogół mają mniejsze długości, co prowadzi do maksymalnej stabilizacji związanej z delokalizacją ładunku [113, 114].



Rysunek 11: Porównanie profili energii w funkcji odległości między wodorem a donorem dla klasycznego wiązania wodorowego (HB) oraz krótkiego silnego wiązania wodorowego (SSHB).

Zdarza się także, że gdy D i A charakteryzują się podobnym powinowactwem do protonu (inaczej podobną wartością pK_a), energia HB może znacznie przekraczać standardowy zakres, czasami osiągając 25–40 kcal/mol, podczas gdy odległość d_{DA} staje się znacznie krótsza ($2.5 \text{ \AA}$ lub nawet mniej) [112, 115, 116, 117]. W takich przypadkach potencjał, w którym znajduje się proton wiązania wodorowego, jest bardziej symetryczny, a

bariera energetyczna dla jego przejścia między donorem i akceptorem jest niewielka. Stąd możliwe stają się niemal swobodne przeskoki protonu między D i A w wyniku ruchów termicznych (i/lub kwantowej delokalizacji). Proton może się zatem znaleźć po stronie D jak i A z równym (albo bardzo zbliżonym) prawdopodobieństwem. Można wówczas mówić, że mamy do czynienia z wiązaniem o dużym charakterze kowalencyjnym, trzech centrach i czterech elektronach. Taką interpretację uzasadnia także topologiczna analiza gęstości elektronowej [110, 118]. Ten specyficzny rodzaj wiązań wodorowych określa się jako silne i krótkie wiązania wodorowe (ang. *Short Strong Hydrogen Bond*, SSHB). Skrajnym przypadkiem takiego SSHB jest sytuacja, gdy potencjał dla ruchu protonu charakteryzuje się pojedynczym minimum energetycznym (proton zlokalizowany jest w pojedynczej studni potencjału pomiędzy D i A). Dotyczy to przede wszystkim układów symetrycznych i homojądrowych, ponieważ w takim przypadku obie formy rezonansowe wiązania są izoenergetyczne i mogą się efektywnie ze sobą mieszać.

Właściwości tego specyficznego wiązania wodorowego, i samo jego powstawanie, są zależne także od otoczenia, w którym znajdują się donor i akceptor. W środowisku niepolarnym, w którym nie istnieje możliwość stworzenia konkurencyjnego HB z rozpuszczalnikiem, SSHB charakteryzują się wyjątkowo korzystnymi energiami swobodnymi tworzenia [110, 119, 108]. W przypadku SSHB obserwuje się również tendencję do bardziej linearnego wiązania wraz z malejącymi odległościami między D i A [112].

Rola SSHB w tworzeniu kompleksów ligand–białko była dotąd słabo zbadana, a interakcje tego typu rzadko analizowano w kontekście chemii medycznej [120, 121]. W dostępnej literaturze brakowało jednoznacznych doniesień wskazujących na ich udział w mechanizmie działania małowcząsteczkowych inhibitorów.

Analiza danych strukturalnych dla kompleksu Bq z *c*-pierścieniem kompleksu F_o ujawniła jednak obecność wyjątkowo krótkiego kontaktu między grupą aminową Bq a resztą Glu59, zaangażowaną w transport protonów. Obserwowana w tych strukturach odległość D–A (ok. $\sim 2,4 - 2,5$ Å) wykracza poza typowe zakresy klasycznych wiązań wodorowych i sugeruje obecność silnego, nisko-barierowego wiązania wodorowego.

W przeszłości tego rodzaju oddziaływanie nie zostało opisane ani zinterpretowane w kontekście wiązania Bq do syntazy ATP. Była to zatem nowa hipoteza, którą postawiłam na podstawie analizy geometrii interakcji w strukturach krystalograficznych (PDB: 6CP5 [98]). Identyfikacja tej cechy wiązania doprowadziła mnie do założenia, że SSHB może odgrywać istotną rolę w stabilizacji kompleksu inhibitora z białkiem, a tym samym przyczyniać się do wysokiej efektywności hamowania obrotu *c*-pierścienia.

2 Cele oraz zakres pracy

Celem niniejszej pracy jest, w oparciu o metody symulacji komputerowych, zrozumienie mechanizmu funkcjonowania kompleksu błonowego F_o białka syntazy ATP oraz jego inhibicji za pomocą związków małowcząsteczkowych. Aby zbadać temat w sposób jak najbardziej wszechstronny, przeanalizowałam zarówno mechanizm rotacji wolnego kompleksu F_o na poziomie pełnoatomowego pola siłowego, jak i rotację kompleksu F_o ze związanym inhibitorem, a także podstawy mechanizmu wiązania inhibitorów na powierzchni białka na poziomie molekularnym i kwantowym. W kolejnych akapitach przedstawiam te cele w sposób bardziej szczegółowy, grupując je według głównych obszarów badawczych i punktów analizy.

Mechanizm rotacji w obrębie kompleksu F_o

Podjęłam się określenia energetyki rotacji c -pierścienia poprzez wyznaczenie profili energii swobodnej dla obrotu o jedną podjednostkę c -pierścienia (pojedynczy krok rotacyjny) w kierunkach odpowiadających syntezie i hydrolizie ATP. Uwzględniłam rolę stanów protonacji kluczowych reszt aminokwasowych – ze szczególnym uwzględnieniem reszt kwasu glutaminowego zlokalizowanych w półkanałach: wiążącym (B) i uwalniającym (R). Skupiłam się również na identyfikacji etapów limitujących rotację, w szczególności określeniu momentów, w których zmiany stanu protonacji wpływają na wysokość barier energetycznych oraz stabilność konformacyjną c -pierścienia.

Mechanizm transferu protonów i indukcja jednokierunkowej rotacji c -pierścienia

Ponadto zajęłam się wyjaśnieniem mechanizmu, dzięki któremu transport protonów w obrębie kompleksu F_o mitochondrialnej syntazy ATP inicjuje i napędza rotację c -pierścienia, prowadząc do efektywnej konwersji energii gradientu protonowego w energię mechaniczną. Skoncentrowałam się na molekularnym mechanizmie transferu protonu oraz wyznaczeniu bariery energetycznej dla procesu protonacji Glu65 przy kącie referencyjnym 0° i ocenie, czy transfer protonu może stanowić etap limitujący w całkowitym mechanizmie rotacji c -pierścienia.

Wpływ argininy na kierunkowość rotacji

Dodatkowo przeanalizowałam rolę wysoce konserwowanej reszty Arg176 w podjednostce a kompleksu F_o mitochondrialnej syntazy ATP oraz jej znaczenie dla kierunkowości i wydajności rotacji c -pierścienia. Zwróciłam szczególną uwagę na hipotezę, zgodnie z którą Arg176 pełni funkcję elektrostatycznej bariery oddzielającej dwa półkanały protonowe i tym samym odpowiada za jednokierunkowy przepływ protonów.

Wpływ inhibitora na rotację kompleksu F_o na przykładzie bedakiliny

Kolejnym celem mojej pracy było pogłębienie wiedzy na temat mechanizmu molekularnego wiązania bedakiliny (Bq) do kompleksu F_o syntazy ATP oraz wyjaśnienie, w

jaki sposób proces ten prowadzi do inhibicji rotacji *c*-pierścienia i blokowania aktywności enzymu. Analiza obejmowała wpływ różnych stanów protonacyjnych reszty Glu65 i inhibitora na energię oraz stabilność tworzonego kompleksu, identyfikując stany protonacji sprzyjające trwałemu wiązaniu inhibitora. Następnie rozszerzyłam badania o oddziaływania z podjednostką *a*, a także przeprowadziłam dekompozycję energii wiązania względem poszczególnych reszt aminokwasowych, identyfikując kluczowe determinanty oddziaływań między inhibitorem a białkiem, które mogą stanowić potencjalne cele w projektowaniu nowych analogów bedakiliny o zwiększonej skuteczności terapeutycznej.

Analiza silnego wiązania wodorowego w aspekcie inhibicji kompleksu F_o

Szczególne uwagę poświęciłam mechanizmowi silnego, skróconego wiązania wodorowego typu SSHB między grupą karboksylową Glu65 a dimetyloaminową grupą Bq. W ramach pracy zaplanowałam analizę tego wiązania przy użyciu hybrydowych symulacji QM/MM oraz oceny profilu energii swobodnej, aby zbadać możliwość dynamicznego współdzielenia protonu między donorami, charakterystycznego dla SSHB. Dodatkowo postawiłam pytanie, w jakim stopniu reszta Asp32 wpływa na stabilizację tego wiązania oraz czy modyfikacja grupy aminowej Bq mogłaby wzmocnić SSHB i zwiększyć powinowactwo inhibitora.

Mechanizm inhibicji syntazy ATP przez bedakilinę

W ramach prowadzonych przeze mnie badań, chciałam lepiej zrozumieć specyfikę wiązania Bq do kompleksu F_o syntazy ATP. W szczególności chciałam sprawdzić, czy klasyczny opis oparty na polu siłowym jest wystarczający do wyjaśnienia mechanizmu stabilizacji kompleksu białko–inhibitor. Analiza ta miała na celu nie tylko lepsze zrozumienie specyfiki wiązania Bq, lecz także wskazanie determinantów odpowiedzialnych za jego selektywność, co w dalszej perspektywie może stanowić punkt wyjścia do projektowania bardziej efektywnych inhibitorów syntazy ATP.

Mechanizm wiązania oligomycyny z białkiem F_o

W celu zbadania uniwersalności mechanizmu inhibicji syntazy ATP przeanalizowałam również działanie oligomycyny (Olg), mitochondrialnego inhibitora syntazy ATP. Określiłam interakcje Olg z kompleksem F_o , ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływań sterycznych, hydrofobowych oraz klasycznych wiązań wodorowych z Glu65. Dzięki strukturze krystalograficznej i symulacjom wymuszonej rotacji *c*-pierścienia określiłam bariery energetyczne i moment, w którym obecność inhibitora prowadzi do zatrzymania rotacji pierścienia. Analiza powinowactwa Olg do *c*-pierścienia oraz wkładu poszczególnych reszt białka w stabilizację kompleksu pozwoliła lepiej zrozumieć mechanizm działania tego inhibitora.

Mechanizm inhibicji kompleksu F_o na przykładzie oligomycyny

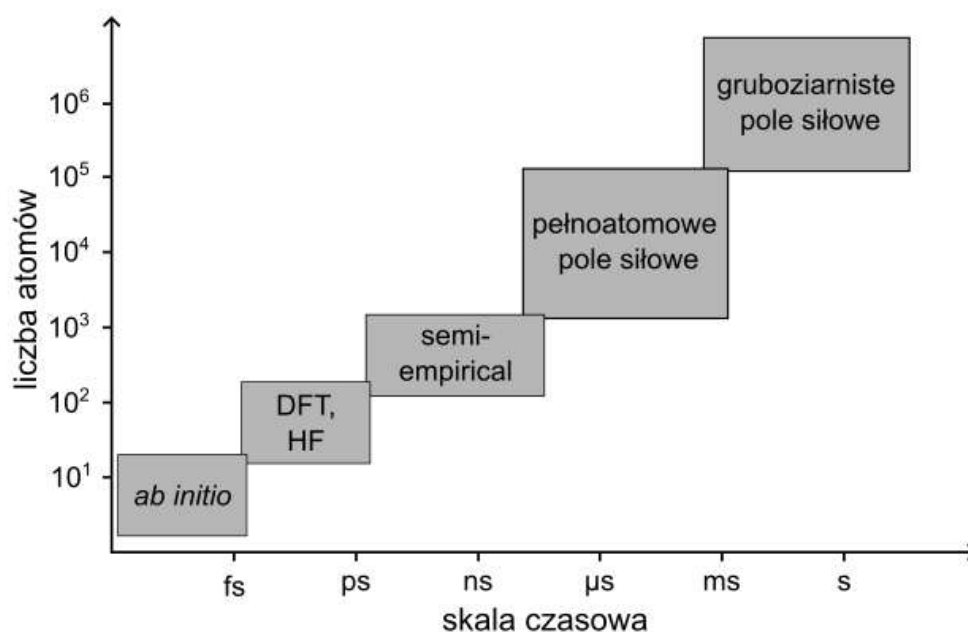
Dla zbadania mechanizmu molekularnego inhibicji kompleksu F_o syntazy ATP przez związek odmienny od Bq, będący jednocześnie inhibitorem kompleksu F_o oligomycynę

(Olg) przeprowadziłam symulacje rotacji c -pierścienia względem podjednostki a , wykazałam, że obecność Olg prowadzi do wprowadzenia bariery energetycznej ograniczającej ruch pierścienia. Przeprowadzone badania pozwoliły mi na porównanie mechanizmu działania Bq oraz Olg, wskazując, że oba związki wywołują podobny efekt funkcjonalny poprzez trwałe związanie na interfejsie c -pierścień/podjednostka a , mimo różnic w charakterze stabilizujących je interakcji.

3 Metody obliczeniowe

3.1 Podstawy teoretyczne

Metody chemii obliczeniowej, rozwijane od lat 50. XX wieku, stanowią obecnie istotne narzędzie w badaniach z zakresu chemii i biologii molekularnej. Umożliwiają one uzyskanie informacji dotyczących struktury związków chemicznych oraz energetyki i dynamiki procesów (bio)molekularnych, takich jak reakcje chemiczne czy przemiany konformacyjne cząsteczek i (bio)polimerów. Zastosowanie mechaniki kwantowej (QM, ang. *Quantum Mechanics*) pozwala na najbardziej precyzyjny opis zjawisk molekularnych. Jednak ze względu na złożoność badanych układów oraz długie skale czasowe charakterystyczne dla wielu procesów, pełny opis kwantowy często wymaga uproszczeń. Wprowadzenie przybliżeń umożliwia znaczną redukcję kosztów obliczeniowych oraz czasu potrzebnego do przeprowadzenia symulacji. Warto podkreślić, że współczesne metody chemii obliczeniowej często dostarczają wyników zgodnych z danymi eksperymentalnymi, dzięki czemu mogą stanowić wartościową alternatywę dla kosztownych i czasochłonnych badań doświadczalnych. Dodatkowo oferują one dostęp do skal czasowych i przestrzennych, które pozostają poza zasięgiem wielu technik eksperymentalnych.



Rysunek 12: Zakres stosowalności metod chemii obliczeniowej pod względem rozmiaru badanego układu oraz skali czasowej procesu. Schemat powstał w oparciu o pracę [122].

3.1.1 Przybliżenie Borna-Oppenheimera

Punktem wyjścia dla opracowania metod symulacji zjawisk biologicznych i reakcji chemicznych jest najbardziej ogólna postać zależnego od czasu równania Schrödingera:

$$\hat{H}\psi = i\hbar \frac{\partial}{\partial t}\psi \quad (1)$$

Przy założeniu, że Hamiltonian $\hat{H}$ nie zależy od czasu, równanie 1 może zostać sprowadzone do rozwiązania problemu własnego dla Hamiltonianu, co odpowiada znalezieniu tzw. stanów własnych (lub stacjonarnych) układu:

$$\hat{H}\psi_i = E_i\psi_i \quad (2)$$

gdzie E_i jest energią i -tego stanu stacjonarnego badanego systemu, a ψ_i jest funkcją falową opisującą ten stan. Operator Hamiltona $\hat{H}$ odpowiada całkowitej energii układu i dla układów molekularnych definiuje się go zwykle jako sumę operatorów opisujących energię kinetyczną jąder atomowych $\hat{T}_n$ i elektronów $\hat{T}_e$ oraz energię potencjalną oddziaływań jądro-jądro $\hat{V}_{nn}$, elektron-elektron $\hat{V}_{ee}$ i jądro-elektron $\hat{V}_{ne}$:

$$\hat{H} = \hat{T}_n + \hat{T}_e + \hat{V}_{nn} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{ne} \quad (3)$$

Jednak dla układów większych niż atom wodoru (problem dwuciałowy) ścisłe analityczne rozwiązanie problemu własnego Hamiltonianu jest niemożliwe. Jednym z przybliżeń, które ułatwia rozwiązanie równania 2 jest tzw. przybliżenie adiabatyczne, które opiera się na założeniu, że masa elektronu jest 1800 razy mniejsza od masy protonu. W rezultacie struktura elektronowa atomów i cząsteczek dostosowuje się nieskończenie szybko do nowych położań jąder. Dzięki temu funkcje falowe, będące rozwiązaniem równania 2 można sfaktoryzować w następujący sposób:

$$\psi_i = \psi_i(\mathbf{x}; \mathbf{R})\phi_i(\mathbf{R}) \quad (4)$$

Pierwszy człon w powyższym równaniu zależy od współrzędnych elektronów $\mathbf{x}$ (trzy współrzędne przestrzenne r i jedna dyskretna współrzędna spinowa, s) a także parametrycznie od położań jąder $\mathbf{R}$. Oznacza to, że dla ustalonego $\mathbf{R}$ ten człon opisuje strukturę elektronową układu. Każdy z tych elektronów jest opisany przez . Jest to tak zwana elektronowa funkcja falowa. Drugi człon równania (4) jest tak zwaną jądrową funkcją falową. Zależy wyłącznie od współrzędnych jąder $\mathbf{R}$ i opisuje ich ruch. Wstawienie takiej postaci rozwiązania do równania 2 oraz zastosowanie tzw. poprawki diagonalnej zaproponowanej przez Borna i Oppenheimera powoduje, że równanie Schrödingera dla ruchu jąder atomowych przyjmuje postać:

$$[\hat{T}_n + E_i^{el}(\mathbf{R})]\phi_i(\mathbf{R}) = E_i\phi_i(\mathbf{R}), \quad (5)$$

gdzie $\hat{T}_n$ jest operatorem energii kinetycznej jąder, a $E_i^{el}(\mathbf{R})$ to energia potencjalna elektronów, zależna od konfiguracji jąder. Energia ta jest wyznaczona na podstawie elektronowego równania Schrödingera, w którym na Hamiltonian elektronowy składają się operator energii kinetycznej elektronów i operatory oddziaływań elektrostatycznych między elektronami, między jądrami oraz między elektronami i jądrami:

$$\hat{H}_{el}\psi_i(\mathbf{x}, \mathbf{R}) = E_i^{el}(\mathbf{R})\psi_i(\mathbf{x}, \mathbf{R}). \quad (6)$$

Przybliżenie Borna-Oppenheimera umożliwia rozdzielenie ruchu elektronów i jąder oraz przedstawienie energii układu molekularnego jako sumy energii elektronowej, wibracyjnej, rotacyjnej i translacyjnej. Rozdzielenie ruchu rotacyjnego i oscylacyjnego jąder cząsteczki od ruchu translacyjnego środka masy układu pozwala na wyeliminowanie kwantowania ruchu translacyjnego. Z równania (5) widać, że wartości własne Hamiltonianu elektronowego E_i^{el} reprezentują hiperpowierzchnię energii potencjalnej dla ruchu jąder w poszczególnych stanach elektronowych. Taki model otwiera perspektywę relatywnie prostego opisu energetyki układu za pomocą funkcji $3N - 6$ współrzędnych (gdzie N to liczba atomów układu), w szczególności w długożyjącym podstawowym stanie elektronowym.

3.1.2 Twierdzenie Hellmanna-Feynmana

Ważnym narzędziem w chemii kwantowej jest twierdzenie Hellmanna-Feynmana, które pozwala na efektywne obliczanie sił działających w ramach układów kwantowych. Mówi ono, że jeśli funkcja falowa Ψ jest dokładnym rozwiązaniem równania Schrödingera dla hamiltonianu $\hat{H}(\lambda)$ zależnego od parametru λ , to pochodna wartości oczekiwanej energii względem λ jest równa wartości oczekiwanej pochodnej hamiltonianu względem tego parametru:

$$\frac{dE}{d\lambda} = - \left\langle \Psi \left| \frac{\partial \hat{H}}{\partial \lambda} \right| \Psi \right\rangle \quad (7)$$

Zatem siły działające na jądra, określone jako ujemne gradienty energii elektronowej, można obliczyć bezpośrednio ze średnich wartości operatora siły:

$$F_k = - \frac{\partial}{\partial R_k} E_i^{el}(\mathbf{R}_1, \mathbf{R}_2, \dots, \mathbf{R}_N) \quad k = (1, 2, \dots, N) \quad (8)$$

Oznacza to, że siły między jądrami można obliczyć na podstawie elektronowej funkcji falowej, bez konieczności bezpośredniego różniczkowania energii całkowitej względem $\mathbf{R}$. W praktyce jest to wykorzystywane w metodach chemii kwantowej i dynamiki molekularnej, gdzie gradienty energii są stosowane do obliczania geometrii równowagowej cząsteczek oraz modelowania ich ruchu.

Twierdzenie Hellmanna-Feynmana pozwala precyzyjnie wyznaczać siły działające na jądra w symulacjach dynamiki molekularnej (MD, ang. *Molecular Dynamics*). W połączeniu z przybliżeniem Borna-Oppenheimera prowadzi to do efektywnego opisu ruchu jąder na powierzchni energii potencjalnej $E_i^{el}(\mathbf{R})$, co jest fundamentem wielu metod modelowania molekularnego, takich jak *ab initio* Molecular Dynamics (AIMD).

W ramach przybliżenia Borna Oppenheimera, jądra traktowane jako klasyczne masy punktowe poruszają się w efektywnym potencjale $E_i^{el}(\mathbf{R})$, co pozwala na opis ewolucji układu w czasie przez całkowanie klasycznych równań ruchu. Problemem pozostaje jednak precyzyjne wyznaczenie $E_i^{el}(\mathbf{R})$ dla układów z dużą liczbą atomów, ponieważ wiąże się z to bardzo wysokimi kosztami obliczeniowymi. W przypadku mniejszych układów rozwiązaniem jest zastosowanie przybliżonych metod mechaniki kwantowej, opartych na zasadzie wariacyjnej, rachunku zaburzeń lub teorii funkcjonału gęstości. Takie podejście stanowi podstawę kwantowych symulacji dynamiki molekularnej w wariancie Borna-Oppenheimera, tzw. *ab initio* Molecular Dynamics (AIMD), gdzie rzeczywista dynamika układu atomów jest przybliżona poprzez iteracyjne rozwiązanie stacjonarnego równania Schrödingera (lub jego odpowiedników opartych na gęstości elektronowej).

3.1.3 Teoria Funkcjonału Gęstości

Powyższe rozważania opierają się na teorii funkcji falowych, która leży u podstaw mechaniki kwantowej w obrazie Schrödingera. Od lat jest to bardzo skuteczna teoria dla dokładnego przewidywania danych termochemicznych, strukturalnych i spektroskopowych dla szerokiego zakresu małych i średnich cząsteczek. Jednak w przypadku układów wielociałowych o dużej liczbie atomów, takich jak białka, kwasy nukleinowe czy nanocząstki, obliczenia w oparciu o funkcje falowe stają się nieefektywne ze względu na złożoność funkcji falowej. Jak zostało wspomniane, funkcje te zależą od położenia wszystkich elektronów. Matematyczna złożoność funkcji falowej opisującej wiele elektronów nie tylko utrudnia jej wyznaczenie, lecz również ogranicza możliwości praktycznego wykorzystania oraz prowadzi do utraty jej intuicyjnej interpretacji. Jednym z kluczowych pojęć w opisie układów wieloelektronowych jest gęstość elektronowa $\rho(\mathbf{r})$, definiowana jako gęstość prawdopodobieństwa znalezienia elektronu w danym punkcie przestrzeni znormalizowana do liczby elektronów N . Formalnie można ją wyrazić przez scałkowanie kwadratu modułu pełnej, antysymetrycznej funkcji falowej ψ po wszystkich współrzędnych spinowych oraz współrzędnych przestrzennych wszystkich elektronów z wyjątkiem jednego:

$$\rho(\mathbf{r}) = N \sum_s \int \dots \int |\psi(\mathbf{r}, s, \mathbf{r}_2, s_2, \dots, \mathbf{r}_N, s_N)|^2 d\mathbf{x}_2 d\mathbf{x}_3 \dots d\mathbf{x}_N, \quad (9)$$

gdzie N oznacza liczbę elektronów.

Ze względu na trudności związane z bezpośrednim wyznaczeniem funkcji falowej układu wieloelektronowego, w chemii obliczeniowej powszechnie stosuje się teorię funkcjonału gę-

stości (ang. *Density Functional Theory*, DFT). Jej podstawowym założeniem jest to, że wszelkie właściwości układu można wyrazić jako funkcjonały gęstości elektronowej $\rho(\mathbf{r})$, a nie funkcji falowej ψ .

W szczególności, w podejściu Kohna-Shama (patrz niżej) przyjmuje się przybliżenie, w którym gęstość elektronowa wyrażana jest jako suma kwadratów modułów jednoelektronowych orbitali (tzw. orbitali Kohna-Shama; KS):

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^N |\psi_i(\mathbf{r})|^2, \quad (10)$$

gdzie $\psi_i(\mathbf{r})$ to i -ty orbital KS, a suma przebiega po wszystkich orbitalach obsadzonych przez elektrony. Należy podkreślić, że jest to konstrukcja pomocnicza – funkcja falowa Kohna-Shama nie jest funkcją falową rzeczywistego układu, lecz wprowadza wygodne narzędzie do obliczania gęstości elektronowej i energii całkowitej układu w ramach DFT.

Tak zdefiniowana gęstość elektronowa $\rho(\mathbf{r})$ jest bezpośrednio związana z prawdopodobieństwem znalezienia elektronu w otoczeniu punktu $\mathbf{r}$, niezależnie od jego stanu spinowego. Ponieważ jednak elektrony są nierozróżnialne, to prawdopodobieństwo znalezienia jednego z N elektronów wynosi N razy prawdopodobieństwo dla pojedynczego elektronu. Zatem gęstość elektronowa całkuje się do liczby elektronów.

$$\int \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = N. \quad (11)$$

Teoria DFT redukuje 3N-wymiarowy problem wyznaczenia funkcji falowej układu molekularnego do trójwymiarowego problemu wyznaczenia gęstości elektronowej $\rho(\mathbf{r})$. Jest to możliwe na podstawie tzw. I twierdzenia Hohenberga-Kohna. Twierdzenie to mówi, że dla układu wieloelektronowego w stanie podstawowym gęstość elektronowa $\rho(\mathbf{r})$ jednoznacznie określa zewnętrzny potencjał $v(\mathbf{r})$, w którym poruszają się elektrony. Gęstość elektronowa w niezdegenerowanym stanie podstawowym jest zatem wystarczająca do zdefiniowania hamiltonianu elektronowego, $\hat{H}_{el}$. Z kolei $\hat{H}_{el}$ na mocy równania 6 jednoznacznie determinuje funkcje falowe opisujące strukturę elektronową układu w stanie podstawowym i stanach wzbudzonych, które dalej determinują wszystkie właściwości fizyczne układu. Dowód tego twierdzenia jest relatywnie prosty i można przeprowadzić go przez *reductio ad absurdum*. Skonstruowanie elektronowego operatora Hamiltona wymaga znajomości liczby elektronów N . Jest to niezbędne, aby zapisać operatory energii kinetycznej oraz operatory energii potencjalnej odpychającej elektron-elektron i przyciągającej elektron-jądra. Wymagana jest również znajomość zewnętrznego potencjału $v(r)$, w którym poruszają się elektrony, generowanego przez jądra (musimy zatem określić rodzaj jąder i ich położenia). Na podstawie powyższych informacji uzyskujemy hamiltonian elektronowy, który pozwala na rozwiązanie elektronowego równania Schrödingera, czyli uzyskanie elektronowych funkcji falowych. Załóżmy, że istnieją dwa zewnętrzne potencjały $v_1(\mathbf{r})$ i $v_2(\mathbf{r})$ (a zatem i dwa

hamiltoniany $\hat{H}_1$ i $\hat{H}_2$) ze stanami podstawowymi Ψ i Ψ' , które generują tę samą gęstość elektronową $\rho(\mathbf{r})$. Wówczas oryginalna zasada wariacyjna mechaniki kwantowej stwierdza, że dwie relacje muszą być jednocześnie spełnione:

$$E_1 < \langle \Psi_2 | \hat{H}_1 | \Psi_2 \rangle = \langle \Psi_2 | \hat{H}_2 | \Psi_2 \rangle + \langle \Psi_2 | \hat{H}_1 - \hat{H}_2 | \Psi_2 \rangle = E_2 + \int (v_1(\vec{r}) - v_2(\vec{r})) \rho(\vec{r}) d^3r \quad (12)$$

oraz

$$E_2 < \langle \Psi_1 | \hat{H}_2 | \Psi_1 \rangle = \langle \Psi_1 | \hat{H}_1 | \Psi_1 \rangle + \langle \Psi_1 | \hat{H}_2 - \hat{H}_1 | \Psi_1 \rangle = E_1 - \int (v_1(\vec{r}) - v_2(\vec{r})) \rho(\vec{r}) d^3r, \quad (13)$$

gdzie E_1 i E_2 to energie układu w stanach, odpowiednio, Ψ_1 i Ψ_2 .

Powstaje zatem sprzeczność:

$$E_1 + E_2 < E_1 + E_2 \quad (14)$$

potwierdzająca twierdzenie Hohenberga-Kohna. Oznacza to, że gęstość elektronowa $\rho(\mathbf{r})$ jednoznacznie określa potencjał $v(\mathbf{r})$, a tym samym także hamiltonian i funkcję falową stanu podstawowego (a także wzbudzonych).

Zgodnie z I twierdzeniem Hohenberga-Kohna energię całkowitą można zatem zapisać jako funkcjonal gęstości elektronowej (podstawowe równanie teorii DFT):

$$E[\rho] = V_{en}[\rho] + T[\rho] + V_{ee}[\rho] = \int \rho(\mathbf{r}) v(\mathbf{r}) d^3r + T[\rho] + V_{ee}[\rho] \quad (15)$$

Człony równania $T[\rho]$, $V_{ee}[\rho]$ i $V_{en}[\rho]$ są funkcjonalami opisującymi, odpowiednio, energię kinetyczną oraz energie potencjalne odpowiednich oddziaływań. Energia potencjalna oddziaływania elektronów z jądrami jest wyrażona jako wynik ich oddziaływania z polem elektrostatycznym o potencjale $v(\mathbf{r})$ generowanym przez jądra, więc może być obliczona w prosty sposób. Niestety, dokładne postacie $T[\rho]$ i $V_{ee}[\rho]$ nie są znane i żadna fundamentalna teoria nie pozwala ich wyprowadzić, więc w praktycznym podejściu funkcjonały te muszą być aproksymowane, często w oparciu o wyniki eksperymentalne.

Kluczowe dla praktycznej realizacji metody DFT jest tzw. II twierdzenie Hohenberga-Kohna, określane także mianem zasady wariacyjnej w teorii funkcjonału gęstości. Twierdzenie to stwierdza, że dla każdego układu elektronowego istnieje funkcjonal energii $E[\rho]$, który osiąga minimum dla rzeczywistej gęstości elektronowej $\rho(\mathbf{r})$ odpowiadającej stanowi podstawowemu tego układu. Oznacza to, że gęstość stanu podstawowego jest tą, która minimalizuje wartość funkcjonału energii. Twierdzenie to implikuje również, że każda inna dopuszczalna gęstość elektronowa prowadzi do wyższej energii całkowitej, co czyni z funkcjonału energii obiekt, który można wykorzystać do wyznaczania stanu podstawowego metodą minimalizacji.

Dowód II twierdzenia Hohenberga-Kohna opiera się na rozumowaniu przez sprowadzenie do sprzeczności. Przyjmijmy, że istnieje inna dopuszczalna gęstość elektronowa $\tilde{\rho}(\mathbf{r})$, różna od rzeczywistej gęstości stanu podstawowego $\rho(\mathbf{r})$, dla której funkcjonal energii przyjmuje niższą wartość:

$$E[\tilde{\rho}] < E[\rho]. \quad (16)$$

Z I twierdzenia Hohenberga-Kohna wiadomo, że gęstości $\tilde{\rho}(\mathbf{r})$ i $\rho(\mathbf{r})$ nie mogą pochodzić od tego samego zewnętrznego potencjału $v(\mathbf{r})$, ponieważ temu potencjałowi odpowiada tylko jedna gęstość stanu podstawowego. W szczególności, jeśli $\tilde{\rho}(\mathbf{r}) \neq \rho(\mathbf{r})$, to nie może ona być gęstością stanu podstawowego badanego układu – pochodzi zatem od innej funkcji falowej $\tilde{\Psi}$, która nie jest stanem podstawowym układu o potencjale $v(\mathbf{r})$.

Zgodnie z zasadą wariacyjną mechaniki kwantowej, energia oczekiwana wyznaczona z dowolnej dopuszczalnej funkcji falowej $\tilde{\Psi}$, innej niż funkcja stanu podstawowego Ψ_0 , spełnia nierówność:

$$\langle \tilde{\Psi} | \hat{H} | \tilde{\Psi} \rangle \geq E_0, \quad (17)$$

gdzie $E_0 = E[\rho]$ oznacza rzeczywistą energię stanu podstawowego badanego układu. Ponieważ funkcja falowa $\tilde{\Psi}$ generuje gęstość $\tilde{\rho}(\mathbf{r})$, można zapisać:

$$E[\tilde{\rho}] = \langle \tilde{\Psi} | \hat{H} | \tilde{\Psi} \rangle \geq E[\rho]. \quad (18)$$

Powyższa nierówność przeczy założeniu początkowemu 16, zgodnie z którym $E[\tilde{\rho}] < E[\rho]$. Otrzymana sprzeczność dowodzi, że żadna inna dopuszczalna gęstość elektronowa $\tilde{\rho}(\mathbf{r}) \neq \rho(\mathbf{r})$ nie może dawać niższej energii niż gęstość rzeczywista. W związku z tym, funkcjonal energii $E[\rho]$ osiąga minimum wyłącznie dla gęstości stanu podstawowego, co kończy dowód II twierdzenia Hohenberga-Kohna.

3.1.4 Metoda Kohna-Shama

Jednym z podejść do rozwiązania problemu konstrukcji przybliżonej funkcji gęstości jest oparta na drugim twierdzeniu Hohenberga-Kohna, propozycja Kohna i Shama. Metoda ta opiera się na podziale całkowitej energii na poszczególne wkłady, które są następnie wyrażane jako funkcjonały gęstości. W podstawowym wariancie wszystkie człony o nieznannej postaci matematycznej łączy się w tym podejściu w jeden człon, który później się parametryzuje. Kohn i Sham, bazując na jednoelektronowej postaci równania Schrödingera, wprowadzili koncepcję nieoddziałującego układu odniesienia zbudowanego ze zbioru spinorbitali opisujących zachowanie pojedynczych elektronów w uśrednionym polu pozostałych elektronów. Dzięki takiemu podejściu można z dużą dokładnością obliczyć więk-

szkość wkładu do energii kinetycznej elektronów, co w podejściach alternatywnych jest problematyczne.

W efekcie złożoność funkcji falowej wielu elektronów zostaje sprowadzona do pojedynczego wyznacznika Slatera, zbudowanego z jednoelektronowych funkcji falowych, wyznaczanych przez samouzgodnione rozwiązanie następującego problemu własnego:

$$\left(-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + v_{eff}(\mathbf{r})\right)\varphi(\mathbf{r}) = \varepsilon\varphi(\mathbf{r}), \quad (19)$$

gdzie $v_{eff}(\mathbf{r})$ to potencjał Kohna-Shama, reprezentujący efektywny potencjał zewnętrzny, w którym poruszają się nieoddziałujące cząstki, dobrany tak, by uzyskać gęstość elektronową identyczną z gęstością układu oddziałujących cząstek. $\varphi_i(\mathbf{r})$ jest funkcją orbitalną Kohna-Shama, a ε_i to wartość własna odpowiadająca tej funkcji, czyli tzw. energia orbitalna. Opierając się więc na metodzie Kohna-Shama, całkowitą energię można przedstawić jako zależną od energii kinetycznej nieoddziałujących elektronów $T[\rho]$, energii samooddziaływania gęstości elektronowej $E_{ee}[\rho]$ (tzw. potencjał Hartree), energii potencjalnej elektronów w zewnętrznym potencjale $v(\mathbf{r})$ oraz nieklasycznej energii wymiennie-korelacyjnej związanej z potencjałem $V_{XC}[\rho]$:

$$E(\rho) = T(\rho) + E_{ee}(\rho) + \int v(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r} + V_{XC}(\rho) \quad (20)$$

Potencjał wymiennie-korelacyjny $V_{XC}(\rho)$ można formalnie zdefiniować jako następującą pochodną wariacyjną:

$$V_{XC} = \frac{\delta E_{XC}(\rho)}{\delta \rho(\mathbf{r})}, \quad (21)$$

gdzie $E_{XC}(\rho)$ składa się z czterech wkładów: energii korelacyjnej, energii wymiennej, korelacyjnej korekty energii kinetycznej oraz członu eliminującego samooddziaływanie elektronów.

Konieczność wprowadzenia przybliżeń wynika z faktu, że niektórych składowych funkcjonału $E_{XC}[\rho]$ nie da się wyznaczyć w pełni dokładnie. W tym celu stosuje się takie podejścia, jak aproksymacja lokalnej gęstości (spinowej) (ang. *Local (Spin) Density Approximation*, LDA) oraz uogólnione przybliżenie gradientowe (ang. *Generalized Gradient Approximation*, GGA).

Jednym z najprostszych przybliżeń jest przybliżenie lokalnej gęstości spinowej (ang. *Local Spin Density Approximation*, LSDA), które w niektórych przypadkach prowadzi do otrzymania członów wymiennych i korelacyjnych o akceptowalnej dokładności. Zakłada ono wykorzystanie analitycznych rozwiązań dla jednorodnego gazu elektronowego jako lokalnej funkcji gęstości. Konsekwencją tego podejścia jest niedoszacowanie energii wymiennej i przeszacowanie energii korelacji. W rzeczywistych układach chemicznych model

jednorodnego gazu elektronowego nie odzwierciedla występującej niejednorodności gęstości elektronowej, przez co prowadzi do systematycznych błędów. Ich skompensowanie wymaga uzupełnienia funkcjonału wymiany i korelacji o zależność od gradientu gęstości elektronowej, co pozwala uwzględnić przestrzenną zmienność tej wielkości.

W przypadku metody LDA gęstość elektronowa jest traktowana jako jednorodny gaz elektronowy, a wyrażenie E_{XC} można zapisać jako:

$$E_{XC}^{LDA}(\rho) = \int \rho(\mathbf{r}) \epsilon_{XC}[\rho(\mathbf{r})] d\mathbf{r}, \quad (22)$$

$$\epsilon_{XC}[\rho(\mathbf{r})] = \epsilon_X[\rho(\mathbf{r})] + \epsilon_C[\rho(\mathbf{r})], \quad (23)$$

gdzie ϵ_{XC} jest energią korelacyjno-wymienną w przeliczeniu na pojedynczą cząstkę jednorodnego gazu elektronowego, która może być podzielona na wkład wymienny i wkład korelacyjny 23. Składową wymienną dla jednorodnego gazu elektronowego można wyrazić następująco:

$$\epsilon_X = -\frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi} \right)^{1/3} \rho(\mathbf{r})^{1/3}. \quad (24)$$

Składową korelacyjną wyznacza się na ogół numerycznie, przy wykorzystaniu metod kwantowego Monte Carlo. Należy jednak zaznaczyć, że metoda LDA sprawdza się wyłącznie dla układów półprzewodnikowych i ciał stałych, gdzie gęstość jest relatywnie jednorodna. Metoda ta jednak zawodzi w układach molekularnych, gdy mamy do czynienia z dużymi zmianami gęstości w obrębie układu ze względu na skończony rozmiar i nieregularne ułożenie cząsteczek.

Metoda GGA uwzględnia zmiany gęstości elektronowej poprzez dodanie do wyrażenia na energię E_{XC} zależności od gradientu gęstości $\nabla\rho$. Zabieg taki zdecydowanie poprawia wyniki, zwłaszcza w kontekście przewidywania struktur molekularnych oraz energii stanu podstawowego cząsteczek:

$$E_{XC}^{GGA}(\rho) = \int \rho(\mathbf{r}) \epsilon_{XC}[\rho(\mathbf{r}), \nabla\rho(\mathbf{r})] d\mathbf{r}. \quad (25)$$

Funkcjonały hybrydowe stanowią kolejny krok w rozwoju DFT. Łączą one człon wymienny obliczony według metody Hartree-Focka z funkcjonałami LDA lub GGA. Jednym z najbardziej popularnych funkcjonałów hybrydowych jest B3LYP, który można zapisać jako:

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1 - a) + aE_X^{HF} + bE_X^{B88} + (1 - c)E_C^{LSDA} + cE_C^{LYP}, \quad (26)$$

przy czym parametry a, b, c są dobierane na podstawie dopasowania do danych eksperymentalnych i wynoszą odpowiednio: $a = 0.20$, $b = 0.72$, $c = 0.81$.

3.1.5 Zestawy funkcji bazowych

Zestaw funkcji bazowych to zbiór funkcji matematycznych, wykorzystywanych do wyrażenia orbitali molekularnych układu, zwykle w formie kombinacji liniowych. Na przestrzeni lat, wraz z rozwojem metod chemii kwantowej opartych na funkcji falowej oraz na teorii funkcjonału gęstości, zaproponowano ogromną kolekcję zestawów funkcji bazowych różniących się rozmiarem, złożonością i wydajnością obliczeniową. Od doboru zbioru bazowego w dużym stopniu zależy precyzja odtworzenia kluczowych cech stanu elektronowego układu, takie jak rozkład gęstości elektronowej, energia całkowita, momenty multipolowe czy właściwości spektralne. Bardzo duże zbiory bazowe są potrzebne w przypadku, gdy celem jest uzyskanie wysokiej jakości funkcji falowych, w szczególności tych uwzględniających efekty korelacyjno-wymienne. W zdecydowanej większości standardowych obliczeń kwantowych, orbitale molekularne są budowane przy użyciu liniowych kombinacji funkcji bazy (tzw. orbitali atomowych) co prowadzi do tzw. przybliżenia LCAO (ang. *linear combination of atomic orbitals*):

$$\varphi_k(\mathbf{r}) = \sum_i c_{ik} \phi_i(\mathbf{r}), \quad (27)$$

gdzie φ_k jest k -tym orbitalem molekularnym, ϕ_i są orbitalami atomowymi (zbiór bazowy), a c_{ik} są współczynnikami rozwinięcia, które zgodnie z zasadą wariacyjną podlegają optymalizacji w kierunku zminimalizowania energii w danym stanie elektronowym układu. Należy przy tym pamiętać, że wykorzystanie większego zbioru bazowego daje lepszy opis orbitali cząsteczki (a zatem także wszelkich jej właściwości), ale jednocześnie koszt obliczeniowy staje się czynnikiem ograniczającym.

3.1.6 Metoda ścisłego wiązania oparta o teorię funkcjonału gęstości; DFTB

Chociaż zastosowanie metod DFT znacząco przyspiesza obliczenia w stosunku do metod opartych na funkcji falowej, to w kontekście zastosowania w dynamice molekularnej są one nadal ograniczone do układów złożonych maksymalnie z ok. 100–200 atomów. Większe układy można badać z wykorzystaniem półempirycznych metod DFT (ang. *semiempirical DFT*), takich jak DFTB (ang. *Density-functional Tight Binding*). W metodzie tej przyjmuje się szereg daleko idących przybliżeń, a część hamiltonianu parametryzuje się dla konkretnych atomów i ich par, wykorzystując wyniki z DFT jako punkt odniesienia.

Punktem wyjścia do konstrukcji DFTB jest rozwinięcie całkowitej energii DFT w szereg Taylora wokół wybranej gęstości elektronowej $\rho^0(\mathbf{r})$. W tym podejściu gęstość elektronowa rzeczywistego układu molekularnego $\rho(\mathbf{r})$ wyraża się zatem jako sumę gęstości referencyjnej $\rho^0(\mathbf{r})$ oraz zaburzenia (zwanego fluktuacją gęstości) $\delta\rho(\mathbf{r})$. W DFTB jako gęstość referencyjną przyjmuje się nałożenie (superpozycję) gęstości elektronowych neutralnych atomów, z których składa się układ:

$$\rho(\mathbf{r}) = \rho_0(\mathbf{r}) + \delta\rho(\mathbf{r}) = \sum_A \rho_0^A(\mathbf{r}) + \delta\rho(\mathbf{r}). \quad (28)$$

Rozwinięcie funkcji energii wymiennie-korelacyjnej do trzeciego rzędu prowadzi do otrzymania następującego wyrażenia na energię całkowitą:

$$\begin{aligned} E^{DFTB} &= \sum_i^{occ} \langle \psi_i | -\frac{1}{2} \nabla^2 + v(\mathbf{r}) + \int \frac{\rho_0(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + V_{xc}[\rho_0(\mathbf{r})] | \psi_i \rangle \\ &+ E_{xc}[\rho_0(\mathbf{r})] + E_{nn} - \int V_{xc}[\rho_0(\mathbf{r})] \rho_0(\mathbf{r}) d\mathbf{r} - \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho_0(\mathbf{r}) \rho_0(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r} d\mathbf{r}' + \\ &\quad \frac{1}{2} \int \int \left(\frac{\delta^2 E_{xc} \rho_0(\mathbf{r})}{\delta \rho(\mathbf{r}) \delta \rho(\mathbf{r}')} + \frac{1}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} \right)_{\rho_0(\mathbf{r})} \delta \rho(\mathbf{r}) \delta \rho(\mathbf{r}') d\mathbf{r} d\mathbf{r}' \quad (29) \\ &\quad + \frac{1}{6} \int \int \int \frac{\delta^3 E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]}{\delta \rho(\mathbf{r}) \delta \rho(\mathbf{r}') \delta \rho(\mathbf{r}'')} \delta \rho(\mathbf{r}'') \big|_{\rho_0(\mathbf{r})} \delta \rho(\mathbf{r}) \delta \rho(\mathbf{r}') \rho(\mathbf{r}'') d\mathbf{r} d\mathbf{r}' d\mathbf{r}'' \\ &= E^0[\rho_0(\mathbf{r})] + E^0[\rho_0(\mathbf{r}), \delta \rho(\mathbf{r})] + E^2[\rho_0(\mathbf{r}), (\delta \rho(\mathbf{r}))^2] + E^3[\rho_0(\mathbf{r}), (\delta \rho(\mathbf{r}))^3]. \end{aligned}$$

W równaniu 29 można wyróżnić cztery istotne człony. Pierwszy z nich, hamiltonian referencyjny $\hat{H}^0$ zależny jest wyłącznie od wybranej gęstości referencyjnej $\rho^0(\mathbf{r})$

$$\hat{H}^0 = -\frac{1}{2} \nabla^2 + v(\mathbf{r}) + \int \frac{\rho_0(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + V_{xc} \rho_0(\mathbf{r}). \quad (30)$$

Rozwiązanie uogólnionego problemu własnego dla tego Hamiltonianu w wybranej (zwykle minimalnej) bazie orbitali pozwala na bardzo szybkie oszacowanie wkładów wiążących oraz jednoelektronowych do całkowitej energii, E_{bnd} . Ponieważ $\hat{H}^0$ zależy wyłącznie od gęstości referencyjnej, rozwiązanie uzyskuje się w jednym kroku bez konieczności prowadzenia procedury samouzgadniania. Dodatkowo elementy macierzowe Hamiltonianu, które zależne są wyłącznie od wzajemnego ułożenia wszystkich par atomów w układzie, są stabilizowane, co eliminuje konieczność obliczania całek.

Drugi człon równania 29 odpowiada za tzw. wkład odpychający:

$$E_{rep}[\rho_0(\mathbf{r})] = E_{nn} + E_{XC}[\rho_0(\mathbf{r})] - \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho_0(\mathbf{r}) \rho_0(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r} d\mathbf{r}' - \int V_{XC}[\rho_0(\mathbf{r})] \rho_0(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (31)$$

Formalnie uwzględnia on szereg różnych wkładów energetycznych, których precyzyjne wyznaczenie jest kosztowne, w tym energię korelacyjno-wymienną oraz odpychanie pomiędzy elektronami rdzeniowymi i odpychanie jądro-jądro. Dodatkowo koryguje on całkowitą energię ze względu na podwójnie uwzględnione człony. W praktycznych zastosowaniach DFTB E_{rep} uzyskuje się poprzez dopasowanie do różnicy pomiędzy energią obliczoną na podstawie DFT a E_{bnd} w funkcji odległości atomowych.

Kolejny człon równania 29 odpowiada za poprawki związane z fluktuacjami gęstości elektronowej względem gęstości referencyjnej:

$$E_{2nd}[\rho_0(\mathbf{r}), \delta\rho(\mathbf{r})] = \frac{1}{2} \int \int \left(\frac{\delta^2 E_{xc}\rho_0(\mathbf{r})}{\delta\rho(\mathbf{r})\delta\rho(\mathbf{r}')} + \frac{1}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} \right)_{\rho_0(\mathbf{r})} \delta\rho(\mathbf{r})\delta(\rho\mathbf{r}') d\mathbf{r}d\mathbf{r}'. \quad (32)$$

Fluktuacje te mogą wynikać z oddziaływań elektronowych, wzbudzeń elektronowych czy efektów dynamicznych. Człon ten opisuje, w jaki sposób zmiany gęstości elektronowej w różnych punktach przestrzeni wpływają na energię układu.

Ostatni człon równania 29 odpowiada za nieliniowe efekty oddziaływań elektronowych:

$$E_{3rd}[\rho_0(\mathbf{r}), \delta\rho(\mathbf{r})^2] = \frac{1}{6} \int \int \int \frac{\delta^3 E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]}{\delta\rho(\mathbf{r})\delta\rho(\mathbf{r}')\delta\rho(\mathbf{r}'')} \delta\rho(\mathbf{r}'') \Big|_{\rho_0(\mathbf{r})} \delta\rho\mathbf{r}\delta\rho\mathbf{r}'\delta\rho\mathbf{r}'' d\mathbf{r}d\mathbf{r}'d\mathbf{r}''. \quad (33)$$

Stanowi on rozszerzenie rozwinięcia Taylora energii funkcjonału DFT do trzeciego rzędu, będąc istotnym wyrazem dla wyższych rzędów aproksymacji DFTB (np. DFTB3).

Ostatecznie można więc przepisać równanie 29 w następujący sposób:

$$E^{DFTB} = \sum_i^{occ} n_i \langle \psi_i | \hat{H}_0 | \psi_i \rangle + E_{rep}[\rho_0(\mathbf{r})] + E_{2nd}[\rho_0(\mathbf{r}), \delta\rho(\mathbf{r})] + E_{3rd}[\rho_0(\mathbf{r}), \delta\rho(\mathbf{r})^2]. \quad (34)$$

W zależności od stopnia rozwinięcia szeregu Taylora, otrzymuje się różne warianty metody. Uwzględnienie jedynie zerowego i pierwszego wyrazu prowadzi do oryginalnej metody DFTB (DFTB1) [123, 124], przydatnej w dynamice molekularnej oraz dla opisów oddziaływań międzycząsteczkowych. Włączenie drugiego rzędu fluktuacji ładunku definiuje metodę DFTB2 (SCC-DFTB) [125], która umożliwia modelowanie dynamicznych zmian rozkładu ładunku, np. przy wzbudzeniach elektronowych lub w reakcjach chemicznych. Dalsze rozszerzenie o człon trzeciego rzędu prowadzi do DFTB3, będącej obecnie najdokładniejszym wariantem w tej klasie metod, wykorzystywanej m.in. do modelowania reakcji chemicznych i procesów w fazie skondensowanej [126, 127].

W metodzie DFTB elementy macierzowe operatora Hamiltona referencyjnego $\hat{H}^0$ zdefiniowanego zgodnie z 30 są wstępnie obliczane i przechowywane w formie tabelarycznej jako tzw. całki Slatera-Kostera. Pozwala to na szybkie oszacowanie wkładów jednoelektronowych i wiążących bez konieczności wykonywania kosztownych operacji całkowania w trakcie symulacji. Tabelaryzacja obejmuje wartości elementów macierzy dla wszystkich par atomów w różnych orientacjach przestrzennych, co pozwala na ich interpolację w trakcie symulacji.

Podobnie energia odpychająca E_{rep} (31), która, jak wspomniałam, uwzględnia wkłady od odpychania jądrowego, energię wymiennie-korelacyjną oraz szereg innych korekt, jest dopasowywana do różnicy pomiędzy energią DFT a pozostałymi członami DFTB. W praktyce dopasowanie to realizowane jest osobno dla każdej pary atomów w funkcji ich odległości, co również prowadzi do powstania tablicowanego potencjału parowego.

Warto też dodać, że dopiero w wariantach DFTB2 i DFTB3 konieczne jest rozwiązanie iteracyjnego problemu samouzgadniania (ang. self-consistent charge; SCC). Proces ten polega na przypisaniu nadmiaru/deficytu ładunku poszczególnym atomom i wyliczeniu jego

wpływu na potencjał elektrostatyczny oraz energię układu, a następnie aktualizacji rozkładu ładunku aż do osiągnięcia zbieżności. Iteracyjność SCC czyni DFTB2 i DFTB3 bardziej kosztownymi obliczeniowo niż DFTB1, ale również istotnie zwiększa ich dokładność w opisach rozkładów ładunku i właściwości elektronowych.

Podsumowując, metoda DFTB stanowi kompromis między kosztami obliczeniowymi a dokładnością modelowania układów chemicznych. Jej półempiryczna natura, oparta na tablicowanych elementach macierzowych i rozwinięciach funkcjonału energii, czyni ją użytecznym narzędziem w badaniach dużych układów molekularnych, w tym w zastosowaniach do długoczasowej dynamiki molekularnej, chemii materiałowej i biologicznej.

3.1.7 Mechanika Klasyczna

Zjawiska zachodzące w skali atomowej mają charakter kwantowo-mechaniczny, dlatego precyzyjnym narzędziem służącym do ich opisu są równania mechaniki kwantowej, w szczególności zależne od czasu równanie Schrödingera. Jednak ze względu na ogromny koszt obliczeniowy takiego podejścia, w praktyce do opisu ewolucji czasowej układów molekularnych często stosuje się techniki mechaniki klasycznej. Podejście takie wymaga przyjęcia przybliżenia Borna-Oppenheimera, które znacząco upraszcza opis energetyki układów molekularnych poprzez wprowadzenie koncepcji hiperpowierzchni energii potencjalnej (PES, *Potential Energy Surface*). Na tej podstawie ruch jąder atomowych może być analizowany w sposób klasyczny, podczas gdy elektrony nieskończenie szybko dopasowują się do aktualnej konfiguracji jąder [5]. W ramach takiego podejścia energia potencjalna układu molekularnego jest opisywana jako funkcja położeń jąder.

Matematyczna formalizacja ewolucji czasowej układów mas została zapoczątkowana przez Newtona w XVII wieku [128]. W mechanice Newtonowskiej dynamikę każdej cząstki w układzie wielociałowym opisuje się przy pomocy następującego równania różniczkowego drugiego rzędu:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \mathbf{F}_i(t) \quad (35)$$

gdzie siła potencjalna $\mathbf{F}_i$ działająca w czasie t na i -tą cząstkę o masie m_i , znajdującą się w położeniu $\mathbf{r}_i$, jest zdefiniowana jako ujemny gradient potencjału:

$$\mathbf{F}_i = -\nabla_{\mathbf{r}_i} E(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N), \quad (36)$$

przy czym $E(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$ to energia potencjalna zależna od konfiguracji N cząstek (np. atomów). Rozwiązaniem równania ruchu Newtona są trajektorie, czyli krzywe w $6N$ -wymiarowej przestrzeni fazowej opisujące położenia i pędy wszystkich N atomów. $3N$ -wymiarowa przestrzeń uwzględniająca wyłącznie położenia N atomów nazywana jest z kolei przestrzenią konfiguracyjną; zestaw chwilowych wartości tych $3N$ położeń to kon-

figuracja. Jeśli punkt początkowy w przestrzeni fazowej jest znany, na podstawie równania 35 można jednoznacznie wyznaczyć ewolucję położenia i pędów N atomów, czyli trajektorię układu w przestrzeni fazowej. Rozwiązanie równania 35 dla liczby cząstek większej niż 2 wymaga podejścia numerycznego, które polega na dyskretyzacji czasu, czyli przyjęciu krótkiego, skończonego kroku czasowego, w którym siły działające na atomy są stałe. Atomy poruszają się więc ruchem jednostajnie przyspieszonym. Po kroku czasowym otrzymuje się zestaw nowych współrzędnych i prędkości, czyli nowy punkt trajektorii w przestrzeni fazowej. Proces ten jest iteracyjny. Oznacza to, że po każdym kroku czasowym obliczane są nowe wartości położenia i pędów na podstawie sił działających w danej chwili. Wielokrotne powtarzanie tego procesu pozwala na wyznaczenie pełnej trajektorii układu w całej przestrzeni fazowej. W praktyce jednak długość trajektorii i liczba iteracji są zależne od dostępnych zasobów obliczeniowych oraz fizycznych właściwości analizowanego systemu.

3.1.8 Algorytmy całkowania równań ruchu

Siły działające na atomy w symulacjach dynamiki molekularnej pochodzą z gradientu energii potencjalnej. Ponieważ energia ta bywa wygodnie wyrażana w układzie współrzędnych wewnętrznych (np. długości wiązań, kąty, kąty dwuścienne), podczas jej przekształcania do współrzędnych kartezjańskich, stosuje się regułę łańcuchową:

$$\frac{\partial E}{\partial x_i} = \sum_k \frac{\partial E}{\partial q_k} \frac{\partial q_k}{\partial x_i}, \quad (37)$$

gdzie x_i to współrzędna kartezjańska, a q_k to współrzędne wewnętrzne. Przekształcenie to stanowi standardową procedurę obliczania sił i poprzedza etap całkowania równań ruchu.

Aby określić ewolucję układu w czasie, należy numerycznie rozwiązać równania ruchu Newtona 35, czyli dokonać ich całkowania. W tym celu stosuje się algorytmy integracyjne, które są kluczowe dla poprawności i stabilności symulacji.

Jednym z najczęściej wykorzystywanych w MD algorytmów jest dwukrokowa metoda Verleta [129]. Jej główną zaletą jest dobra stabilność numeryczna oraz zachowanie energii całkowitej układu w dłuższej skali czasowej. Algorytm ten opiera się na obliczaniu położenia cząstek w chwili $t + \Delta t$ na podstawie położenia z chwil t oraz $t - \Delta t$. Tym samym wykorzystuje przybliżoną postać drugiej pochodnej funkcji położenia względem czasu, co odpowiada przejściu od pochodnych ciągłych do różnic skończonych w czasie.

W celu wyprowadzenia metody Verleta, położenie cząstki rozwijane jest w szereg Taylora wokół chwili t , zarówno w przód, jak i wstecz:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt}\Delta t + \frac{1}{2}\frac{d^2\mathbf{r}_i(t)}{dt^2}\Delta t^2 + \frac{1}{6}\frac{d^3\mathbf{r}_i(t)}{dt^3}\Delta t^3 + \mathcal{O}(\Delta t^4), \quad (38)$$

$$\mathbf{r}_i(t - \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) - \frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt}\Delta t + \frac{1}{2}\frac{d^2\mathbf{r}_i(t)}{dt^2}\Delta t^2 - \frac{1}{6}\frac{d^3\mathbf{r}_i(t)}{dt^3}\Delta t^3 + \mathcal{O}(\Delta t^4). \quad (39)$$

Dodanie i odjęcie stron równań 38 i 39 prowadzi do wyrażenia na położenie i -tego atomu:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_i(t - \Delta t) + \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i}\Delta t^2 + \mathcal{O}(\Delta t^4). \quad (40)$$

Podobną procedurę stosuje się dla otrzymania wyrażenia na prędkość i -tego atomu w czasie t , wyznaczaną jako symetryczny iloraz różnicowy:

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt} = \frac{\mathbf{r}_i(t + \Delta t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t)}{2\Delta t} + \mathcal{O}(\Delta t^2) \quad (41)$$

Główną wadą tego algorytmu jest różnica w precyzji wyznaczania położenia i prędkości atomów (błąd zależny odpowiednio od czwartej i drugiej potęgi kroku czasowego). Prędkości wyznaczane są pośrednio na podstawie różnicy położenia w kolejnych krokach czasowych, zamiast być obliczane bezpośrednio. W efekcie stosowane przybliżenia prędkości charakteryzują się większym błędem i mogą być niewystarczające w sytuacjach wymagających wysokiej precyzji, takich jak obliczanie właściwości kinetycznych układu. Ponadto wyznaczanie prędkości polega na dzieleniu różnicy dwóch liczb o podobnej wartości, co powoduje wysoką wrażliwość na skończoną precyzję numeryczną. Dodatkowo prędkość jest określana z jednokrokovym opóźnieniem względem położenia, co może prowadzić do niepożądanego zjawiska tzw. dryfu energii całkowitej. Zgodnie z prawami dynamiki Newtona, w symulacji układu izolowanego o stałej energii całkowitej, energia ta powinna pozostawać niezmienna w czasie. W praktyce jednak, między innymi na skutek dyskretyzacji i aproksymacji numerycznych, energia układu może ulegać stopniowym, niefizycznym zmianom.

Sposobem na częściowe obejście problemów z klasycznym algorytmem Verleta jest jego modyfikacja prowadząca do metody tzw. zabiegu skoku (ang. *leap-frog*):

$$\mathbf{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \mathbf{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\mathbf{F}_i}{m_i}\Delta t + \Theta(\Delta t^3), \quad (42)$$

$$\mathbf{r}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)\delta t + \Theta(\Delta t^3). \quad (43)$$

Dzięki temu możemy zredukować problem numerycznego zaokrąglania liczb przy zachowaniu dobrej wydajności obliczeniowej. Ustalone w każdym kroku prędkości pozostają jednak przesunięte o pół kroku w stosunku do położenia. Rozwiązaniem, które łatwo eliminuje ten problem, jest obliczenie prędkości jako średniej z dwóch sąsiednich kroków według równania:

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{\mathbf{v}_i(t - \frac{\Delta t}{2}) + \mathbf{v}_i(t + \frac{\Delta t}{2})}{2}. \quad (44)$$

Faktem pozostaje, że algorytm Verleta i jego modyfikacje stanowią obecnie grupę najczęściej stosowanych podejść do całkowania równań ruchu w dynamice molekularnej. Charakteryzują się wieloma zaletami, jak odwracalność w czasie i zachowanie symplektycznego charakteru przestrzeni fazowej. Ponadto nie wykazują tendencji do wykładniczej rozbieżności z rzeczywistą trajektorią, jaką charakteryzują się niektóre bardziej kosztowne metody wielokrokowe. Dzięki temu, mimo że całkowita energia układu w schemacie Verleta nie jest zachowana, to stałą wartość zachowuje Hamiltonian nieznacznie zaburzony względem rzeczywistego Hamiltonianu układu. W efekcie całkowita energia oscyluje wokół wartości rzeczywistej, co nazywa się zachowanym cieniem Hamiltonianu. Główną zaletą algorytmów Verleta pozostaje jednak przede wszystkim bardzo dobra wydajność obliczeniowa.

3.1.9 Krok czasowy

Krok czasowy Δt jest kluczowym parametrem w symulacjach dynamiki molekularnej. Jego długość jest zwykle wynikiem kompromisu między potrzebą stabilnych obliczeń a chęcią "pokrycia" jak największego obszaru przestrzeni fazowej. Określa on więc, o ile przesuwa się czas w kolejnych iteracjach obliczeniowych oraz jak dokładnie jest odtwarzana trajektoria układu. Im krótszy Δt , tym obliczona trajektoria będzie bardziej stabilna i precyzyjna, ale całkowity czas symulacji może być wówczas zbyt krótki, aby uzyskać zespół konfiguracji układu reprezentatywny dla badanego problemu. Zbyt długi krok może z kolei prowadzić do dryfu energii oraz niestabilności numerycznych, wynikających z tworzenia zbyt bliskich kontaktów między centrami oddziaływań.

W symulacjach klasycznej dynamiki molekularnej układów "chemicznych" najczęściej stosuje się krok czasowy równy 2 fs. Wymaga to jednak wyeliminowania z opisu najszybszych ruchów w układach molekularnych, jakimi są oscylacje wiązań kowalencyjnych z udziałem atomu wodoru. Dokonuje się tego poprzez zamrożenie tych wiązań w ich podstawowym stanie oscylacyjnym (co w klasycznym opisie odpowiada zamrożeniu długości wiązania). Potrzeba ta wynika stąd, że oscylacje lekkich atomów wodoru, nawet w temperaturze fizjologicznej, mają okres rzędu 20 fs, a dziesięć kroków czasowych na jedną oscylację to za mało, żeby uniknąć błędów dyskretyzacji oraz dryfu energii. Zamrożenie długości wiązań jest też korzystne ze względu na to, że eliminuje niefizyczną część pojemności cieplnej układu, która wynikałaby z klasycznego opisu oscylacji wiązań. W rzeczywistości, nawet w relatywnie wysokich temperaturach kwantowe oscylatory wiązań praktycznie nie ulegają wzbudzeniom, pozostając w stanie podstawowym. Nie kontrybuują one zatem do pojemności cieplnej.

Powiązany problemem jest sposób wyznaczania temperatury układu, którą w symulacjach estymuje się na podstawie średniej energii kinetycznej atomów, zgodnie z zasadą ekwipartycji energii. W klasycznym opisie bardzo szybkie drgania wiązań X-H są trakto-

wane tak, jakby mogły przyjmować pełną energię kinetyczną odpowiadającą temperaturze układu. W rzeczywistości, ze względu na efekty kwantowe, ich energia jest w dużej mierze „zamrożona” w stanie podstawowym i nie powinna w pełni wchodzić do puli energii termicznej. Jeśli jednak w modelu klasycznym wliczy się ją do średniej, otrzymuje się wartość energii kinetycznej, a więc i temperatury, większą, niż odpowiada faktycznemu stanowi termicznemu układu. Nałożenie więzów na wiązania X–H eliminuje ten błąd, dzięki czemu temperatura wyliczona na podstawie ekwipartycji jest fizycznie poprawna.

W przypadku dynamiki molekularnej w wariancie *ab initio* (AIMD) najczęściej stosuje się krok czasowy 0.5 fs. Zastosowanie w AIMD przybliżenia adiabatycznego wymaga, by kolejne konfiguracje jąder nie różniły się od siebie zbyt bardzo. Dzięki temu, mimo dyskretyzacji czasu, układ w trakcie dynamiki pozostaje na powierzchni energii potencjalnej odpowiadającej stanowi podstawowemu. W sytuacji, gdy użyty krok czasowy byłby zbyt długi, relaksacja funkcji falowej do właściwego stanu podstawowego przy nowej konfiguracji jąder byłaby trudna do zrealizowania. Doprowadziłoby to do niepoprawnego wyznaczania sił i błędów numerycznych, a w konsekwencji do niepoprawnej predykcji właściwości strukturalnych i termodynamicznych układu. Ze względu na krótki krok czasowy w symulacjach AIMD na ogół nie stosuje się więzów na długości wiązań kowalencyjnych.

3.1.10 Długości wiązań i więzy

W klasycznym opisie częstotliwości oscylacji długości wiązań oraz kątów płaskich w warunkach fizjologicznych są wysokie z powodu dużych stałych siłowych, które opisują ich energetykę. Amplitudy tych oscylacji są jednak niewielkie, co ma niewielki wpływ na ogólną konformację i dynamikę układów molekularnych. Ta cecha umożliwia nałożenie więzów na niektóre stopnie swobody, co w praktyce oznacza ich "zamrożenie" w podstawowym stanie oscylacyjnym.

Jedną z najczęściej stosowanych metod zamrażania długości wiązań i kątów płaskich jest tzw. algorytm SHAKE [130]. Opiera się on na technice nieoznaczonych mnożników Lagrange’a. Metoda ta pozwala na łatwą konstrukcję równań ruchu dla układu spełniającego więzy holonomiczne:

$$-m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} \left(V(\mathbf{r}) + \sum_{k=1}^{N_c} \lambda_k(t) \sigma_k(\mathbf{r}) \right), \quad i = 0, 1, \dots, N, \quad (45)$$

gdzie $\lambda_k(t)$ jest zależnym od czasu mnożnikiem Lagrange’a, który pozwala na uwzględnienie więzów w układzie, a σ_k jest funkcją więzu, określającą konkretne ograniczenie nałożone na układ. Zwykle jest to różnica między rzeczywistą długością wiązania a zadaną wartością, zgodnie z równaniem:

$$\sigma_k(\mathbf{r}) = |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|^2 - d_{ij}^2 = 0. \quad (46)$$

Pierwszy człon po prawej stronie równania 45 odpowiada siłom w układzie bez więzów, podczas gdy drugi reprezentuje siły odpowiadające wprowadzonym więzom (ograniczeniom). Oznacza to zastosowanie klasycznego algorytmu Verleta, a następnie skorygowanie uzyskanych położeń w oparciu o siły więzów i obliczone mnożniki Lagrange’a. W wyniku tego skorygowane wartości położeń muszą spełniać równanie więzów, które przebiega następująco:

$$\sigma_k(\mathbf{r}(t + \delta t)) = 0 \quad k = 1, 2, \dots, N_c \quad (47)$$

Algorytm powyższy można stosować do usztywniania w zasadzie dowolnych mechanicznych stopni swobody w układach molekularnych w trakcie klasycznej dynamiki. Warto jednak dodać, że dla prostego modelu cząsteczki wody opracowano analityczną (i przez to wydajniejszą) wersję algorytmu SHAKE o nazwie SETTLE [131].

Jako alternatywę dla SHAKE zaproponowano także szybszy i mniej uniwersalny algorytm LINCS [132], który bazuje na rozważaniach geometrycznych i stosuje się go następująco:

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}_i(t)\delta t^2 + \mathbf{D}_i(t)\delta t, \quad (48)$$

gdzie: $\mathbf{r}_i(t)$ to wektor położenia atomu w czasie t , $\mathbf{v}_i(t)$ to prędkość atomu w czasie t , $\mathbf{a}_i(t)$ to przyspieszenie atomu w czasie t , δt to krok czasowy, a $\mathbf{D}_i(t)$ to korekta związana z więzami (poprawka, którą w ramach algorytmu LINCS stosuje się w celu wymuszenia ograniczeń geometrycznych wynikających z nałożenia więzów).

Algorytm LINCS został zaprojektowany jako szybka i stabilna alternatywa dla metody SHAKE w narzucaniu więzów geometrycznych w symulacjach dynamiki molekularnej. Znajduje zastosowanie przede wszystkim w usztywnianiu długości wiązań kowalencyjnych, co pozwala na eliminację wysokoczęstotliwościowych drgań, szczególnie tych związanych z lekkimi atomami, jak wodór. Umożliwia to stosowanie dłuższych kroków czasowych bez pogarszania stabilności symulacji.

Zamiast iteracyjnego rozwiązywania układów równań, LINCS wykorzystuje rozwinięcie liniowe więzów oraz obliczenia macierzowe oparte na przybliżeniu odwrotności macierzy wiązań (tzw. macierzy kierunków), co pozwala na szybką i jednokrokową korektę położeń atomów w celu spełnienia warunków geometrycznych. Metoda ta jest szczególnie efektywna przy dużej liczbie nałożonych więzów, zapewniając wysoką stabilność numeryczną.

Ze względu na swoją wydajność i efektywność obliczeniową, LINCS został przyjęty jako domyślny algorytm narzucania więzów w pakiecie GROMACS.

3.1.11 Temperatura i ciśnienie

Z punktu widzenia mechaniki klasycznej, temperatura układu molekularnego jest miarą średniej energii kinetycznej ruchu postępowego jego cząsteczek. Ciśnienie natomiast odpowiada średniej sile, jaką cząsteczki wywierają na jednostkową powierzchnię graniczną układu w kierunku prostopadłym do tej powierzchni. Obie wielkości mają istotne znaczenie nie tylko w gazach, ale również w cieczach i ciałach stałych, gdzie stanowią podstawowe parametry opisujące stan termodynamiczny.

W symulacjach dynamiki molekularnej temperatura i ciśnienie są kluczowe dla kontroli warunków układu oraz dla interpretacji jego zachowania. Wpływają na przebieg procesów takich jak dyfuzja, reakcje chemiczne, zmiany fazowe czy ewolucja struktury i dynamiki układu.

Temperatura układu jest ściśle związana z rozkładem prędkości cząsteczek. Choć ruchy termiczne mają charakter chaotyczny, to statystyczne własności tego ruchu można opisać za pomocą rozkładu . Rozkład, zależny parametrycznie od temperatury układu, określa prawdopodobieństwo, że dana cząsteczka w danym momencie ma określoną wartość prędkości. Wynika on z wprost z podstawowych złożeń mechaniki statystycznej – formalizmu, która pozwala opisać właściwości makroskopowe układów na podstawie ich zachowania mikroskopowego (patrz dalej). Rozkład Maxwella–Boltzmanna ma postać:

$$f(v) = 4\pi \left(\frac{m}{2\pi k_B T} \right)^{2/3} v^2 e^{-\frac{mv^2}{2k_B T}}. \quad (49)$$

Zachowanie podczas symulacji tego rozkładu, a zatem także temperatury, jest istotne dla prawidłowego odwzorowania rzeczywistej dynamiki układu.

Najprostszą metodą kontroli temperatury w symulacjach MD jest okresowe skalowanie prędkości cząsteczek tak, aby ich energia kinetyczna odpowiadała zadanej temperaturze T . Podejście to jest jednak rzadko stosowane ze względu na liczne ograniczenia. Choć nie zaburza ono statystycznego rozkładu prędkości (np. Maxwella–Boltzmanna), prowadzi do nienaturalnych, nieciągłych zmian trajektorii cząsteczek oraz dryfu energii całkowitej układu. Regularne przeskalowywanie prędkości zakłóca spójność dynamiczną symulacji, uniemożliwiając odtworzenie realistycznych ruchów cząsteczek. Dodatkowo, ponieważ układy o skończonej liczbie stopni swobody wykazują naturalne fluktuacje temperatury, tłumienie ich przez mechaniczne dostosowywanie prędkości może prowadzić do błędnej oceny wielkości termodynamicznych, takich jak pojemność cieplna. Z tych powodów metoda ta nie jest zalecana w precyzyjnych badaniach symulacyjnych i została wyparta przez bardziej zaawansowane techniki termostatowania.

W praktyce, aby lepiej odwzorować rzeczywiste zachowanie układów, stosuje się bardziej wyrafinowane termostaty, czyli algorytmy pozwalające kontrolować temperaturę. Termostaty takie nie tylko utrzymują zadaną temperaturę, ale także pozwalają na jej naturalne fluktuacje, zgodne z rozkładem kanonicznym.

Jedną z najprostszych do dziś stosowanych metod utrzymania stałej temperatury jest termostat Berendsena [133]. Działa on na zasadzie modyfikacji prędkości cząsteczek w taki sposób, aby średnia energia kinetyczna odpowiadała założonej temperaturze. Dla każdego atomu w układzie prędkość jest „wygładzana” w każdym kroku symulacji, tak aby całkowita energia kinetyczna układu (T_k) nie odbiegała od wartości zgodnej z zadaną temperaturą (T_0) za pomocą parametru czasu sprzężenia τ , który określa szybkość dopasowania temperatury do wartości odnośnej. Proces ten polega na stopniowej regulacji prędkości cząsteczek (v_i), w celu ich „schłodzenia” lub „rozgrzania” do pożądanej wartości, zgodnie z równaniem:

$$v_i(t + \Delta t) = \sqrt{\left[1 + \frac{\Delta t}{\tau} \left(\frac{T_0}{T_k} - 1\right)\right]} v_i(t). \quad (50)$$

Choć podejście to jest bardziej „delikatne” niż proste skalowanie prędkości – ponieważ zmiany rozkładają się w czasie i nie powodują gwałtownego przeskalowania prędkości – to jednak nie rozwiązuje podstawowego problemu fizycznego: tłumienia naturalnych fluktuacji temperatury. Termostat Berendsena nie generuje poprawnych zespołów termodynamicznych, co skutkuje m.in. błędnym wyznaczeniem takich wielkości termodynamicznych jak pojemność cieplna. Z tego względu metoda ta nie jest odpowiednia do symulacji, których celem jest poprawne odtworzenie statystycznych własności zespołu.

Innym podejściem do kontrolowania temperatury jest termostat Andersena [134], w którym prędkości poszczególnych cząsteczek są okresowo „resetowane” — z pewnym prawdopodobieństwem losowo wybierana cząsteczka otrzymuje nową prędkość wylosowaną z rozkładu Maxwella–Boltzmanna odpowiadającego zadanej temperaturze. Metoda ta jest prosta do zaimplementowania i gwarantuje prawidłowy rozkład prędkości w stanie równowagi, co czyni ją poprawną z punktu widzenia statystycznej mechaniki zespołu kanonicznego (NVT). Jednak mechanizm losowego przeskakiwania między stanami zakłóca ciągłość trajektorii i nie zachowuje dynamicznych korelacji prędkości. W efekcie termostat Andersena nie nadaje się do badania właściwości dynamicznych układu, takich jak dyfuzja czy funkcje korelacyjne czasu.

Algorytmem umożliwiającym uzyskanie poprawnego zespołu statystycznego dla układu w stałej temperaturze jest też termostat Noségo–Hoovera. Jest to najprostszy przedstawiciel tzw. metod z rozszerzonym lagranżjanem (ang. *extended-Lagrangian methods*), w których do układu wprowadza się dodatkowe stopnie swobody modelujące kontakt z abstrakcyjną łaźnią cieplną — nie w sensie fizycznego oddziaływania, lecz jako formalne narzędzie umożliwiające kontrolę temperatury zgodną z rozkładem kanonicznym.

Termostat ten pozwala na utrzymanie średniej temperatury blisko zadanej wartości przy jednoczesnym zachowaniu fizycznych fluktuacji energii kinetycznej, co odróżnia go od metod takich jak Berendsen. W oryginalnym formalizmie Noségo zmienna czasu ulega przeskalowaniu:

$$\delta t = s(t') \delta t' \quad (51)$$

gdzie δt jest czasem rzeczywistym, $\delta t'$ czasem wirtualnym, a $s(t')$ czynnikiem skalującym, będącym jednocześnie "położeniem" dodanego stopnia swobody. Ten sposób sterowania dynamiką można interpretować jako mechanizm sprzężenia zwrotnego: przy dużej energii kinetycznej (a więc temperaturze wyższej niż zadana), czynnik skalujący s rośnie, co wydłuża krok w czasie rzeczywistym i tym samym „chłodzi” układ. Analogicznie, gdy temperatura jest zbyt niska, s maleje, skracając krok czasu rzeczywistego, co odpowiada przyspieszeniu ruchów i zwiększeniu temperatury.

W praktycznych implementacjach stosuje się uproszczoną wersję zaproponowaną przez Hoovera, w której równania ruchu są modyfikowane bez potrzeby skalowania czasu eksplícite. Modyfikacja ta zachowuje prawidłowy rozkład kanoniczny i pozwala na badanie właściwości dynamicznych układu bez sztucznego tłumienia fluktuacji.

Podobne metody wykorzystuje się do utrzymania zadanego ciśnienia w układzie, z tą różnicą, że przeskalowaniu na podstawie rozkładu podlegają położenia atomów, a nie prędkości. Zmiany ciśnienia, a tym samym położenia atomów, prowadzą do zmian rozmiaru układu. Za utrzymanie stałego ciśnienia odpowiadają barostaty. Do najpopularniejszych należą barostat Berendsena i Parrinello-Rahmana [135, 136].

Pierwszy z nich polega na skalowaniu współrzędnych przestrzennych cząsteczek oraz wymiarów komórki symulacyjnej za pomocą współczynnika skalującego $\lambda(t)$ który zależy od czasu i kontroluje rozmiar układu:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \lambda(t) \mathbf{r}_i(t), \quad (52)$$

gdzie $\mathbf{r}_i$ to położenie i -tej cząsteczki. Współczynnik $\lambda(t)$ jest aktualizowany w każdym kroku symulacji zgodnie z:

$$\lambda(t + \Delta t) = \lambda(t) \left[1 + \frac{\Delta t}{\tau_p} \left(\frac{P_{target}}{P_t} - 1 \right) \right], \quad (53)$$

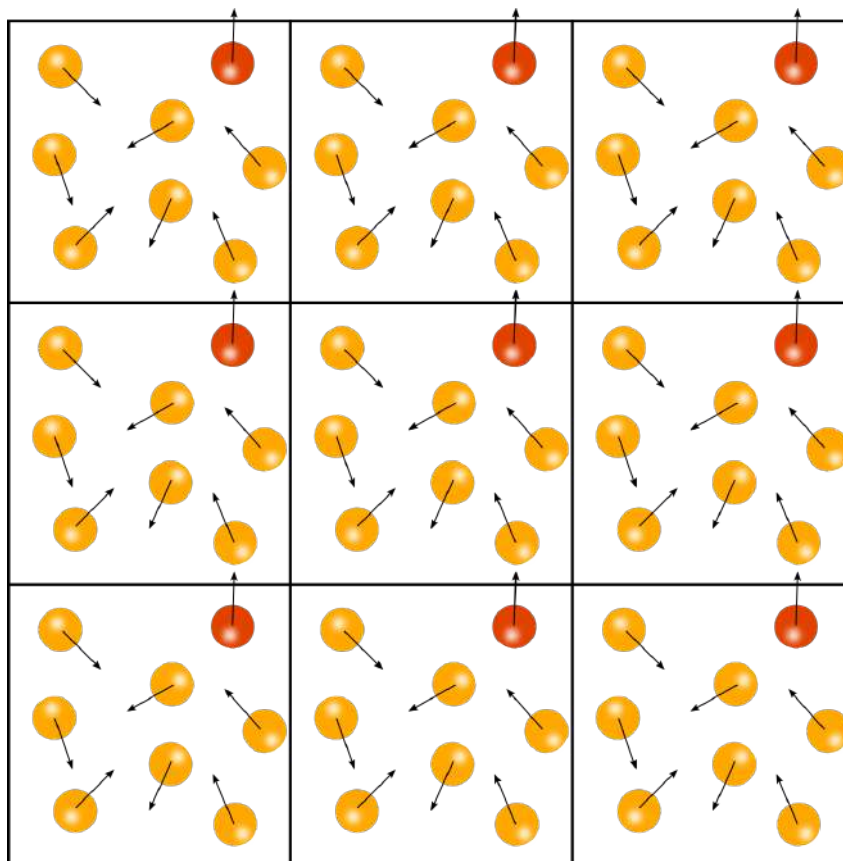
gdzie P_t to aktualne, a P_{target} to zadane ciśnienie, τ_p to czas sprzężenia barostatu, określający szybkość adaptacji objętości układu.

Barostat Berendsena steruje więc objętością (poprzez $\lambda(t)$) w sposób płynny i rozciągnięty w czasie, dążąc do zbliżenia ciśnienia do wartości zadanej. Jednakże, podobnie jak termostat Berendsena, tłumí on naturalne fluktuacje objętości, co prowadzi do zaniżenia ścisłości układu i niewłaściwego rozkładu statystycznego. Metoda ta nie odzwierciedla fizycznej dynamiki układu-łazi ciśnieniowej, ani nie zachowuje poprawnego zespołu NPT.

W przeciwieństwie do tego, barostat Parrinello-Rahmana traktuje wymiary oraz kształt komórki symulacyjnej jako dynamiczne stopnie swobody, które mogą zmieniać się niezależnie i anizotropowo w czasie symulacji. Dzięki temu umożliwia fizycznie uzasadnione

odzwierciedlenie naturalnych fluktuacji zarówno objętości, jak i kształtu układu, co jest szczególnie istotne przy badaniu zjawisk związanych z deformacjami strukturalnymi czy przejściami fazowymi. Taka elastyczność w modelowaniu komórki pozwala na zachowanie poprawnych właściwości termodynamicznych, w tym realistycznych rozkładów naprężeń i ściśliwości, zapewniając tym samym dokładniejszą i bardziej wiarygodną symulację rzeczywistych układów molekularnych.

3.1.12 Periodyczne warunki brzegowe



Rysunek 13: Dwuwymiarowy schemat periodycznych warunków brzegowych (PBC) ilustrujący, w jaki sposób atom opuszczający pudło symulacyjne jest zastępowany przez jego obraz periodyczny

Układy będące w sferze naszego zainteresowania często charakteryzują się dużą liczbą oddziałujących atomów, których ewolucja czasowa opisana jest za pomocą równań Newtona. Koszt obliczeniowy całkowania tych równań rośnie zwykle proporcjonalnie do kwadratu liczby atomów, ponieważ każda cząsteczka formalnie oddziałuje ze wszystkimi innymi, a zatem liczba par oddziaływań wynosi $N(N - 1)/2$ i rośnie jak N^2 , gdzie N to liczba atomów w układzie. W praktyce oznacza to, że podwojenie liczby atomów może skutkować nawet czterokrotnym wzrostem wymagań obliczeniowych. Z tego powodu, aby symulacje były wykonalne, konieczne jest przestrzenne ograniczenie rozmiarów badanych

układów. W tym celu stosuje się tzw. pudła symulacyjne, w których umieszcza się wybrany fragment układu, najistotniejszy z punktu widzenia badanego zjawiska. Pozwala to na efektywne wykorzystanie zasobów obliczeniowych i umożliwia przeprowadzenie symulacji w rozsądnym czasie.

Pudło symulacyjne o skończonych wymiarach można by umieścić w próżni, co jednak prowadziłoby do powstania niefizycznych efektów brzegowych. Atomy znajdujące się przy krawędziach pudła nie miałyby sąsiadów po jednej stronie, co mogłoby skutkować zaburzeniami ich dynamiki, a nawet zjawiskiem „odparowywania” — ucieczki cząsteczek z układu. Aby temu zapobiec, można by zastosować zewnętrzny potencjał ograniczający ruchy atomów do obszaru zdefiniowanego pudła. Jednak takie podejście wpływa na rozkłady energii kinetycznej i potencjalnej atomów, co zniekształca fizyczne właściwości układu i nie odzwierciedla naturalnej dynamiki.

Zamiast tego w symulacjach powszechnie stosuje się periodyczne warunki brzegowe (ang. *Periodic Boundary Conditions*, PBC) (Rys. 13). W tej metodzie pudło symulacyjne traktowane jest jako elementarna komórka nieskończonej sieci okresowej. Każdy atom posiada nieskończenie wiele periodycznych obrazów, a gdy cząsteczka opuszcza pudło z jednej strony, jej obraz pojawia się po stronie przeciwnej, co zapewnia ciągłość i jednorodność symulowanego ośrodka oraz eliminuje niepożądane efekty brzegowe wynikające z pustej przestrzeni.

Należy jednak pamiętać, że PBC mogą powodować artefakty związane ze sztucznie narzuconą periodycznością układu. Dlatego dobór odpowiedniej wielkości pudła symulacyjnego jest kluczowy — zbyt małe pudło prowadzi do niefizycznych oddziaływań cząsteczek z ich własnymi obrazami, co zniekształca wyniki, natomiast zbyt duże pudło zwiększa koszty obliczeniowe i może ograniczać efektywność próbkowania przestrzeni fazowej.

3.1.13 Mechanika molekularna i pola siłowe

W klasycznej dynamice molekularnej energia elektronowa w i -tym stanie elektronowym (zwykle w stanie podstawowym, $E_0^{el}(\mathbf{r})$) jest zastępowana empirycznym modelem oddziaływań reprezentowanym przez skalarną energię potencjalną (w skrócie potencjał) $V(\mathbf{r})$. W wielu zastosowaniach pozwala to na satysfakcjonującą aproksymację powierzchni energii potencjalnej wynikającej z przybliżenia Borna-Oppenheimera. W celu dokonania tej aproksymacji definiuje się zwykle centra oddziaływań, które na ogół umieszcza się w położeniach jąder i identyfikuje jako atomy. W modelu empirycznym energię potencjalną $V(\mathbf{r})$ traktuje się jako addytywną sumę wkładów pochodzących od poszczególnych rodzajów oddziaływań. Matematyczna forma tej funkcji wraz z odpowiednim zestawem parametrów bywa określana jako pole siłowe (ang. *force field*, FF). W empirycznych polach siłowych stosowanych do opisu układów biomolekularnych energia potencjalna układu jest sumą wkładów związanych z deformacją geometrii molekularnej (tzw. człony wiążące; V_{bonded})

i wkładów odpowiedzialnych za oddziaływania niezwiązanych atomów (tzw. człony niewiązące; $V_{nonbonded}$):

$$V(\mathbf{r}) = V_{bonded} + V_{nonbonded} \quad (54)$$

Energie związane z członami wiążącymi są odpowiedzialne za opis lokalnej struktury cząsteczek wynikający z istnienia określonej sieci wiązań kowalencyjnych pomiędzy atomami. Najczęściej wykorzystywane są tutaj potencjały odpowiadające zmianom długości wiązań i kątów między wiązaniem oraz rotacjom wokół tych wiązań. Stosowanym układem współrzędnych jest najczęściej tzw. układ współrzędnych wewnętrznych (długości wiązań, kąty płaskie oraz kąty torsyjne). Z jednej strony pozwala to opisywać energetykę cząsteczki w sposób bardzo intuicyjny, z drugiej jednak komplikuje nieco algorytmy obliczeniowe, ponieważ dynamika molekularna realizowana jest we współrzędnych kartezjańskich.

Energia oddziaływania między niezwiązanymi atomami $V_{nonbonded}$ jest zwykle definiowana jako suma wkładów dwuciałowych, zależnych tylko od odległości między atomami. Obejmuje ona zarówno oddziaływania międzycząsteczkowe, jak i nielokalne oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe (stosuje się wykluczenia dla par atomów oddalonych o jedno lub dwa oddziaływania kowalencyjne). Na część $V_{nonbonded}$ pola siłowego składają się człony odpowiadające oddziaływaniom elektrostatycznym, oddziaływaniom van der Waalsa, a czasami także wiązaniom wodorowym.

Dla większości pól siłowych funkcja energii potencjalnej może być zapisana w następujący sposób:

$$V = V_{bon} + V_{ang} + V_{dih} + V_{imp} + V_{vdW} + V_{el} + V_{ext} + V_{add}, \quad (55)$$

gdzie:

V_{bon} - wkład związany ze zmianą długości wiązań,

V_{ang} - wkład związany ze zmianą wartości kątów płaskich,

V_{dih} - wkład związany ze zmianą wartości kątów torsyjnych,

V_{imp} - wkład związany ze zmianą wartości tzw. niewłaściwych kątów torsyjnych,

V_{vdW} - wkład odpowiadający oddziaływaniom van der Waalsa,

V_{el} - wkład odpowiadający oddziaływaniom elektrostatycznym,

V_{ext} - wkład opisujący oddziaływania z polami zewnętrznymi,

V_{add} - specjalny potencjał, który może być wykorzystany np. do usztywnienia wybranych stopni swobody lub ich sprzężenia.

Wkłady do energii potencjalnej związane z deformacją długości wiązań lub kątów płaskich są w większości pól siłowych (choć nie wszystkich) opisywane przez potencjał harmoniczny:

$$V_{bon} = \sum \frac{1}{2} k_{gh}^b (r_{gh} - r_{gh}^0)^2, \quad (56)$$

$$V_{ang} = \sum \frac{1}{2} k_{ghi}^a (\theta_{ghi} - \theta_{ghi}^0)^2, \quad (57)$$

gdzie k_{gh}^b i k_{ghi}^a są odpowiednimi stałymi siłowymi, r_{gh} jest odległością między atomami g i h , a θ_{ghi} jest wartością kąta płaskiego między wiązaniami tworzonymi przez atomy g i h oraz h i i . r_{gh}^0 i θ_{ghi}^0 są referencyjnymi wartościami, odpowiednio, odległości i kąta płaskiego, odpowiadającym minimum energetycznemu w izolowanym układzie (czasami nazywane wartościami równowagowymi danej współrzędnej wewnętrznej). Potencjał harmoniczny dobrze odzwierciedla zachowanie długości wiązań i kątów w otoczeniu minimów energii odpowiadających ich wartościom referencyjnym. Zdecydowanie przeszacowuje jednak wartości dla większych odchyłeń od stanu równowagi, co skutkuje między innymi niemożnością zerwania wiązania kowalencyjnego w modelach opartych na typowych polach siłowych. Ze względu na to, że wyraźnym odkształceniom zarówno kątów płaskich, jak i długości wiązań od ich wartości referencyjnych zawsze towarzyszy znaczny wzrost energii, współrzędne te nazywane są "twardymi" stopniami swobody. W normalnych warunkach zakres ich oscylacji jest dość ograniczony. Z tego powodu, jak już wspominałam, w symulacjach dynamiki molekularnej często "zamraża się" niektóre lub nawet wszystkie takie "twarde" współrzędne, co umożliwia wydłużenie kroku czasowego i eliminuje "klasyczne" przeszacowanie pojemności cieplnej.

Zdecydowana większość interesujących własności konformacyjnych i dynamicznych makrocząsteczek wynika ze złożonych współzależności pomiędzy oddziaływaniami niewiązującymi a potencjałem torsyjnym, który opisuje zmiany energii wynikające z obrotu części cząsteczki wokół pojedynczego wiązania.

Kąt torsyjny, nazywany także kątem dwuściennym, definiuje się jako kąt pomiędzy dwiema płaszczyznami: pierwszą wyznaczoną przez trzy kolejne atomy g, h, i oraz drugą wyznaczoną przez atomy h, i, j przy czym atomy h i i są połączone wiązaniem wokół którego następuje rotacja. Wartość kąta torsyjnego zależy od przestrzennego ułożenia tych dwóch płaszczyzn względem siebie i może się zmieniać od $-\pi$ do π .

Potencjał torsyjny opisuje barierę energetyczną, jaką cząsteczka musi pokonać, aby wykonać rotację wokół danego wiązania:

$$V_{tors} = \sum \frac{1}{2} k_{ghij}^t \left[1 + \cos \left(n \varphi_{ghij} - \varphi_{ghij}^0 \right) \right], \quad (58)$$

gdzie: k_{ghij}^t to odpowiednia stała siłowa (amplituda potencjału), n to tzw. krotność, czyli liczba minimów energetycznych przypadających na pełen obrót wokół rozpatrywanego wiązania, φ_{ghij} to kąt torsyjny (dwuścienny) dla atomów g, h, i, j , a φ_{ghij}^0 to czynnik fazowy, który przesuwą położenie minimów energetycznych w funkcji kąta. Potencjał ten

ma postać okresowej funkcji kosinusoidalnej, co pozwala modelować symetryczne bariery energetyczne związane z rotacją wokół pojedynczych wiązań — na przykład w łańcuchach alkanowych, gdzie konformacja trans (anty-periplanarne ułożenie atomów) odpowiada wartości kąta około π a konformacje typu *gauche* — kątom w okolicach ± 60 .

W niektórych przypadkach jednak opis przy pomocy wyżej opisanych członów wiążących nie wystarcza, aby zachować poprawną geometrię cząsteczki. Dotyczy to szczególnie układów zawierających atomy węgla o hybrydyzacji sp^2 , takich jak pierścienie aromatyczne, grupy karbonylowe czy układy sprzężone. W takich przypadkach niezbędne jest wymuszenie płaskości określonych fragmentów struktury cząsteczki.

Jednym z podejść to umożliwiających jest wprowadzenie tzw. niewłaściwych kątów torsyjnych (ang. *improper torsions*). Niewłaściwy kąt torsyjny jest kątem dwuściennym zdefiniowanym dla czterech atomów, z których jeden (np. h) jest centralny i połączony z trzema pozostałymi (g, i, j). Kąt ten mierzy odchylenie atomu centralnego od płaszczyzny wyznaczonej przez atomy (g, i, j). W przypadku geometrii planarnych (np. w cząsteczkach benzenu) jego wartość powinna wynosić 0 lub π , w zależności od przyjętej konwencji.

Aby wymusić zachowanie tej płaskości, stosuje się zwykle potencjał harmoniczny:

$$V_{imp} = \sum \frac{1}{2} k_{ghij}^i (\xi_{ghij} - \xi_{ghij}^0)^2, \quad (59)$$

gdzie k_{ghij}^i to stała stała siłowa dla niewłaściwego kąta torsyjnego, ξ_{ghij} to aktualna wartość kąta, a ξ_{ghij}^0 to jego wartość odnośna (najczęściej 0 lub π). Niewłaściwe kąty torsyjne stosuje się głównie w celu penalizacji odchyień od określonej geometrii, a nie do opisu rotacji. Jak wspomniałam, służą one m.in. do utrzymania planarności układów sp^2 lub do zachowania chiralności centrów stereogenicznych poprzez kontrolę wzajemnego ułożenia grup atomów.

W większości pól siłowych oddziaływania niewiążące w układzie opisywane są jako suma energii oddziaływań van der Waalsa (60) oraz oddziaływań elektrostatycznych (61). Oddziaływania van der Waalsa są tutaj zdefiniowane jako wypadkowa dwóch składowych: silnego odpychania sterycznego działającego na bardzo krótkich odległościach międzyatomowych oraz słabszej dyspersyjnej siły przyciągającej, która również stosunkowo szybko maleje wraz ze wzrostem odległości. Do opisu obu tych rodzajów oddziaływań w polach siłowych wykorzystuje się zwykle potencjał Lennarda-Jonesa:

$$V_{LJ} = \sum_i^N \sum_{j>i}^N \epsilon_{ij} \left(\left(\frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^6 \right), \quad (60)$$

w którym wartość ϵ_{ij} odpowiada głębokości minimum energii potencjalnej, r_{ij} jest odległością między atomami i i j , a r_{ij}^0 jest odległością pomiędzy atomami w minimum potencjału.

W praktyce, aby ograniczyć liczbę par atomów, dla których obliczane są oddziaływa-

nia, stosuje się promień odcięcia (r_c), powyżej którego wkład do energii oddziaływania jest pomijany. Umożliwia to redukcję złożoności obliczeniowej z $\mathcal{O}(N^2)$, wynikającej z konieczności obliczenia wszystkich $\frac{N(N-1)}{2}$ odległości między parami atomów, do $\mathcal{O}(N)$, zakładając równomierne rozmieszczenie cząstek w przestrzeni. Dla zapewnienia ciągłości potencjału oraz jego pochodnych w pobliżu r_c , wprowadza się tzw. funkcję wyłączającą (ang. *switching function*), która wygładza potencjał do zera w punkcie odcięcia.

Dodatkowo wykorzystuje się listę sąsiadów Verleta, zawierającą atomy znajdujące się w rozszerzonym promieniu $r_c + \delta r$. Pozwala to unikać kosztownej aktualizacji listy w każdej iteracji, ponieważ drobne przesunięcia atomów nie wpływają natychmiast na jej aktualność. W praktyce często stosuje się dwie takie listy: jedna obejmująca bliższe sąsiedztwo, aktualizowana częściej, oraz druga dla dalszego otoczenia, aktualizowana rzadziej.

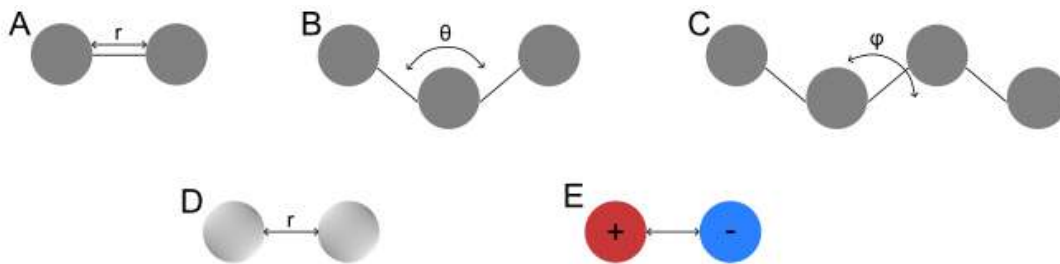
Zastosowanie odcięcia odległości sprawdza się dla oddziaływań van der Waalsa, jednak nie jest wystarczające dla oddziaływań elektrostatycznych, które zanikają znacznie wolniej – ich energia maleje odwrotnie proporcjonalnie do odległości:

$$V_{el} = \sum_i^N \sum_{j>i}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}}, \quad (61)$$

gdzie q_i i q_j oznaczają ładunki cząstkowe atomów i oraz j , ϵ_0 przenikalność dielektryczną próżni, ϵ_r względną przenikalność dielektryczną ośrodka, a r_{ij} odległość między atomami i oraz j . Ładunki cząstkowe mają charakter modelowy (nie są de facto obserwabnymi) i są przypisywane atomom w taki sposób, aby jak najlepiej odtwarzały rozkład potencjału elektrostatycznego wokół cząsteczki, wyznaczony np. na podstawie obliczeń kwantowo-chemicznych lub dopasowania do danych eksperymentalnych.

Ze względu na dalekozasięgowy charakter oddziaływań elektrostatycznych, odcięcie odległości prowadziłoby do istotnych błędów. W celu efektywnego i dokładnego uwzględnienia tych oddziaływań stosuje się metodę Particle Mesh Ewald (PME) [137]. Polega ona na podziale całkowitego potencjału elektrostatycznego na dwie części: krótkozasięgową, obliczaną bezpośrednio w przestrzeni rzeczywistej w obrębie promienia odcięcia, oraz dalekozasięgową, wyznaczaną w przestrzeni odwrotnej za pomocą szybkiej transformaty Fouriera (FFT). Dzięki temu złożoność obliczeniowa zostaje zredukowana do $\mathcal{O}(N \log N)$, przy zachowaniu wysokiej precyzji.

W przypadku klasycznej mechaniki molekularnej, stosowane pola siłowe mogą w przybliżeniu odwzorowywać hiperpowierzchnię energii potencjalnej układu w zakresie procesów, które nie wymagają opisu kwantowego — takich jak zmiany konformacyjne czy rotacje wiązań. W tym ujęciu pozwalają one identyfikować stabilne, niskoenergetyczne stany konfiguracyjne, odpowiadające minimom energii na tej powierzchni. Mechanika molekularna wykorzystywana jest w tym kontekście do przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej i lokalizowania takich stanów przez iteracyjne wyznaczanie współrzędnych wszystkich centrów oddziaływania. Dla procesów wymagających uwzględnienia efektów kwantowych



Rysunek 14: Ilustracja wkładów tworzących pole siłowe: (A) Rozciąganie długości wiązań. (B) Zmiana kątów płaskich. (C) Zmiana kątów torsyjnych. (D) Oddziaływania Van der Waalsa. (E) Oddziaływania elektrostatyczne.

(np. transferu protonów czy reakcji chemicznych) konieczne są jednak inne metody, takie jak mechanika kwantowa lub podejścia hybrydowe QM/MM.

3.1.14 Elementy termodynamiki statystycznej

Warto zauważyć, że przy przewidywaniu wielkości mierzalnych eksperymentalnie, właściwości makroskopowe, wynikające często ze złożonych zachowań w skali atomowej, mają większe znaczenie niż pojedyncza szczegółowa trajektoria układu na poziomie molekularnym (konkretny zestaw połączonych w czasie mikrostanów układu). Termodynamika statystyczna dostarcza solidnego matematycznego formalizmu umożliwiającego przewidywanie właściwości makroskopowych układu na podstawie jego trajektorii dynamicznych wygenerowanych w MD. W termodynamice statystycznej wprowadza się koncepcję zespołów – rozkładów statystycznych wszystkich możliwych mikrostanów danego układu (lub alternatywnie, wielu realizacji układu) ważonych zgodnie z prawdopodobieństwem ich wystąpienia. Termodynamika statystyczna jest wykorzystywana do ilościowej analizy właściwości makroskopowych na podstawie zachowania układu na poziomie mikroskopowym, stanowi zatem pomost pomiędzy zachowaniem układu na poziomie mikroskopowym a jego makroskopowymi właściwościami mierzonymi w eksperymentach.

Podstawowym postulatem mechaniki statystycznej jest jednakowe prawdopodobieństwo wystąpienia zdegenerowanych stanów mikroskopowych układu (mikrostanów), a więc mikrostanów o takiej samej energii całkowitej (E). Powyższy postulat uzasadnia między innymi definicję entropii jako miary liczby mikrostanów odpowiadających stanowi termodynamicznemu (mikrostanowi) zdefiniowanemu przez określony skład układu (N), objętość (V) i energię (E):

$$S(V, N, E) = k_B \ln \Omega(N, V, E), \quad (62)$$

gdzie k_B jest stałą Boltzmanna, a $\Omega(N, V, E)$ oznacza liczbę wszystkich możliwych mikrostanów (czyli konfiguracji pozycji i pędów cząstek) w zadanym stanie makroskopowym

(termodynamicznym). Zestaw wszystkich tych mikrostanów dla układu o stałej energii, objętości i liczbie cząstek, nazywany jest zespołem mikrokanonicznym. Odpowiada on zatem układowi izolowanemu, który nie wymienia z otoczeniem ani energii, ani materii. Jego funkcją charakterystyczną, czyli taką, która jednoznacznie określa jego (równowagowy) stan termodynamiczny, jest entropia.

Innym szeroko stosowanym rodzajem zespołu statystycznego jest zespół kanoniczny. Charakteryzuje on układy, które mogą wymieniać energię z otoczeniem, ale nie wymieniają z nim materii. Oznacza to, że układ jest w kontakcie z otoczeniem o stałej temperaturze. W takim układzie energia może się zmieniać w wyniku wymiany energii z otoczeniem, ale liczba cząsteczek i objętość pozostają stałe.

Prawdopodobieństwo, że układ opisany zespołem kanonicznym znajduje się w danym mikroście i dane jest przez rozkład Boltzmanna:

$$P_i = \frac{1}{Q(N, V, T)} \exp\left(-\frac{E_i}{k_B T}\right), \quad (63)$$

gdzie E_i to energia i -tego stanu, k_B to stała Boltzmanna, a $Q(N, V, T)$ to funkcja rozdziału, będąca sumą po wszystkich możliwych mikrostanach zespołu kanonicznego:

$$Q(N, V, T) = \sum_i \exp\left(-\frac{E_i}{k_B T}\right). \quad (64)$$

Funkcja rozdziału odgrywa kluczową rolę, ponieważ służy jako czynnik normalizujący całkowite prawdopodobieństwo do 1 i umożliwia wyprowadzenie wszystkich funkcji termodynamicznych układu w zespole kanonicznym. W szczególności, energia swobodna Helmholtza F układu w stanie zdefiniowanym przez makroskopowe parametry N , V i T dana jest wzorem:

$$F(T, V, N) = -k_B T \ln Q(N, V, T). \quad (65)$$

Znając funkcję rozdziału, można obliczyć średnią wartość dowolnej innej wielkości fizycznej A , np. energii, ciśnienia czy momentu pędu, jako wartość średnią po zespole statystycznym:

$$\langle A \rangle = \sum_i A_i P_i = \frac{\sum_i A_i e^{-E_i/k_B T}}{Q(N, V, T)}, \quad (66)$$

gdzie A_i to wartość obserwabli A w mikroście i .

W klasycznym opisie często przechodzi się od sum po mikrostanach do całkowania po przestrzeni fazowej, czyli zbiorze wszystkich możliwych położzeń $\mathbf{r}$ i pędów $\mathbf{p}$ cząstek:

$$\langle A \rangle = \frac{1}{Q} \int \int A(\mathbf{r}, \mathbf{p}) \exp\left(-\frac{H(\mathbf{r}, \mathbf{p})}{k_B T}\right) d\mathbf{r} d\mathbf{p}, \quad (67)$$

gdzie $H(\mathbf{r}, \mathbf{p})$ to klasyczny Hamiltonian układu, a więc jego całkowita energia wyrażona jako funkcja położeń i pędów, a $A(\mathbf{r}, \mathbf{p})$ to wartość obserwabli w danym punkcie przestrzeni fazowej. Odpowiadająca temu funkcja rozdziału ma postać:

$$Q = \int \int \exp \left(-\frac{H(\mathbf{r}, \mathbf{p})}{k_B T} \right) d\mathbf{r} d\mathbf{p}. \quad (68)$$

Wyrażenia powyższe i analogiczne formalnie umożliwiają obliczenie wszystkich interesujących wielkości charakteryzujących układ, jednak w praktyce wyznaczenie tych całek dla układów wielocząstkowych jest bardzo trudne z powodu wielowymiarowości przestrzeni fazowej (6N).

W symulacjach dynamiki molekularnej stosuje się zatem podejście alternatywne: zakłada się, że trajektoria generowana przez układ w czasie odwzorowuje właściwy rozkład prawdopodobieństwa mikrostanów. Wówczas średnią wartość obserwabli można aproksymować przez średnią czasową:

$$\langle A \rangle = \langle A \rangle_{time} = \frac{1}{\tau} \int_0^\tau A(\mathbf{r}(t), \mathbf{p}(t)) dt, \quad (69)$$

gdzie τ to czas trwania symulacji. Zgodnie z hipotezą ergodyczną, dla dostatecznie długiej trajektorii czasowa średnia obserwabli pokrywa się ze średnią zespółową:

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \langle A \rangle_{time} = \langle A \rangle_{ens}, \quad (70)$$

W praktyce, wartość $\langle A \rangle_{time}$ oblicza się dyskretnie jako średnią po kolejnych krokach symulacji:

$$\langle A \rangle_{time} = \frac{1}{M} \sum_{i=0}^M A(\mathbf{r}_i, \mathbf{p}_i), \quad (71)$$

gdzie M to liczba kroków czasowych, a $(\mathbf{r}_i, \mathbf{p}_i)$ to konfiguracje układu zapisane w kolejnych momentach czasu. W praktyce głównym problemem symulacji dynamiki molekularnej jest fakt, że z uwagi na ograniczone zasoby obliczeniowe uzależnienie średnich $\langle A \rangle_{time}$ jest często bardzo trudne.

3.1.15 Energia swobodna

Często przywoływanym kryterium spontaniczności procesów jest zmiana energii swobodnej układu. W zależności od przyjętego zespołu statystycznego, a zatem w zależności od ustalonych parametrów makroskopowych, definiuje się różne formy tej energii: w zespole kanonicznym (NVT) jest to energia swobodna Helmholtza, F , natomiast w zespole izotermiczno-izobarycznym (NPT) – energia swobodna Gibbsa, G . Przejście układu ze stanu A do stanu B jest spontaniczne wówczas, gdy towarzysząca mu zmiana energii swobodnej jest ujemna. Różnice energii swobodnej określają termodynamiczną preferencję

układu do populowania dostępnych stanów w warunkach równowagi. Tego typu termodynamiczny opis jest jednak na ogół niewystarczający w przypadku analizy reakcji chemicznych i innych procesów molekularnych, w których przejścia pomiędzy poszczególnymi stanami odbywają się relatywnie wolno. Wówczas kluczowe znaczenie ma także znajomość energii swobodnych stanów przejściowych, która determinuje szybkość reakcji lub procesu. Stan przejściowy (ang. *transition state*) reprezentuje punkt o najwyższej energii swobodnej na ścieżce reakcji pomiędzy stanem początkowym a końcowym. Nawet jeśli różnica energii swobodnej między stanami A i B sugeruje, że proces jest termodynamicznie korzystny (czyli $\Delta G < 0$), to w praktyce bariera między nimi może być na tyle wysoka, że reakcja nie będzie zachodzić spontanicznie w interesującej nas skali czasowej. Znajomość pełnego profilu energii swobodnej $G(\xi)$ wzdłuż współrzędnej reakcji łączącej A i B zapewnia zatem pełny opis termodynamiczny procesu, jak i umożliwia wnioskowanie na temat jego kinetyki. Warto przypomnieć, że równowaga termodynamiczna między rozważanymi stanami jest scharakteryzowana albo przez różnice energii swobodnej między nimi, albo przez stosunek stałych szybkości dla reakcji wprost i reakcji odwrotnej.

Profil energii swobodnej wzdłuż współrzędnej ξ można zdefiniować następująco:

$$G(\xi) - G(\xi^*) = -k_B T \ln \left[\frac{\langle \rho(\xi) \rangle}{\langle \rho(\xi^*) \rangle} \right], \quad (72)$$

gdzie (k_B) to stała Boltzmanna, $G(\xi)$ jest energią swobodną układu w funkcji współrzędnej reakcji ξ opisującej ścieżkę procesu, a $\rho(\xi)$ jest gęstością prawdopodobieństwa znalezienia układu w konkretnym punkcie wzdłuż współrzędnej reakcji, zdefiniowaną jako:

$$\langle \rho(\xi) \rangle = \frac{\int \delta(\xi(\mathbf{r}) - \xi) e^{-H(\mathbf{r}, \mathbf{p})/k_B T} d\mathbf{r} d\mathbf{p}}{\int e^{-H(\mathbf{r}, \mathbf{p})/k_B T} d\mathbf{r} d\mathbf{p}}, \quad (73)$$

gdzie $\delta(x)$ to delta Diraca, $\xi(\mathbf{r})$ jest funkcją definiującą współrzędną reakcji, która zależy od jednego lub większej liczby stopni swobody. $\xi(\mathbf{r})$ może być zasadniczo dowolną funkcją położeń atomów, jednak najczęściej jako współrzędne reakcji stosuje się odległości międzyatomowe, kąty płaskie lub dwuścienne a także ich kombinacje liniowe.

Profil energii swobodnej bywa także czasem określany jako potencjał średniej siły (ang. *Potential of Mean Force*, PMF) i w związku z tym można go wyznaczyć przez całkowanie średniej siły działającej w układzie wzdłuż współrzędnej reakcji $\langle F(\xi) \rangle_\xi$. Rzeczywiście, można łatwo pokazać, że uśredniona siła działająca wzdłuż ξ jest równoważna (ujemnej) pochodnej energii swobodnej $G(\xi)$ względem współrzędnej reakcji:

$$\begin{aligned} \frac{dG(\xi)}{d\xi} &= \frac{d}{d\xi} \left[-k_B T \ln \int d\mathbf{r} \exp \left(-\frac{E(\mathbf{r})}{k_B T} \right) \right] = -k_B T \frac{\frac{d}{d\xi} \int d\mathbf{r} \exp \left(-\frac{E(\mathbf{r})}{k_B T} \right)}{\int d\mathbf{r} \exp \left(-\frac{E(\mathbf{r})}{k_B T} \right)} \\ &= -k_B T \frac{\int d\mathbf{r} \frac{dE}{d\xi} \exp \left(-\frac{E(\mathbf{r})}{k_B T} \right)}{\int d\mathbf{r} \exp \left(-\frac{E(\mathbf{r})}{k_B T} \right)} = \left\langle \frac{dE}{d\xi} \right\rangle_\xi = -\langle F(\xi) \rangle_\xi \end{aligned} \quad (74)$$

Wiele symulacji dynamiki molekularnej układów o znaczeniu chemicznym lub biologicznym ma na celu wyznaczanie profilu energii swobodnej wzdłuż wybranej współrzędnej reakcji opisującej badany proces. Niestety, bardzo często nie jest możliwe uzyskanie tego profilu w skończonym czasie w konwencjonalnej symulacji, ponieważ wymagałoby to uzyskania uzbieżnionego i wiarygodnego oszacowania gęstości prawdopodobieństwa $\langle \rho(\xi) \rangle$. Wynika to z faktu, że często trudno jest efektywnie próbkować wysokoenergetyczne rejony przestrzeni konformacyjnej odpowiadające barierom energii swobodnej pomiędzy stanami. W praktyce okazuje się, że im bardziej złożony jest badany proces, tym bariery energetyczne są często wyższe, a ich pokonanie wymaga dużo dłuższych czasów symulacji, a w związku z tym także szybko rosnących zasobów obliczeniowych. W konwencjonalnej symulacji układ może "utknąć" w pojedynczym stanie konformacyjnym przez bardzo długi czas, nie docierając do innych istotnych stanów, które mogłyby mieć wpływ na kształt profilu energii swobodnej. W konsekwencji, próba oszacowania $G(\xi)$ na podstawie takich trajektorii daje niepełny a więc i niewiarygodny obraz rzeczywistego krajobrazu energetycznego. Z tego powodu opracowano szereg metod tzw. usprawnionego próbkowania, które ułatwiają pokonywanie barier energii swobodnej, a tym samym pozwalają na bardziej precyzyjny opis termodynamiki i kinetyki procesu.

Próbkowanie parasolkowe

Jedną z najpopularniejszych technik usprawnionego próbkowania jest metoda próbkowania parasolkowego (ang. *umbrella sampling*; US), która bada przestrzeń konformacyjną wzdłuż wybranej współrzędnej opisującej interesujący nas proces, zwanej współrzędną reakcji. W metodzie tej przeprowadza się serię symulacji z przyłożonym zewnętrznym potencjałem $V(\xi)$, który utrzymuje układ w pobliżu zadanych wartości (jedno- lub wielowymiarowej) współrzędnej reakcji opisującej postęp procesu. W praktyce, zewnętrzne potencjały są często rozmieszczane wzdłuż wybranej współrzędnej reakcji ξ w regularnych odstępach, tworząc tzw. „okna” symulacyjne. Okna pokrywają zachodzące na siebie przedziały współrzędnej ξ , a przyłożone w nich potencjały skupiają próbkowanie wokół konkretnych, zwykle centralnych punktów w tych przedziałach. Dzięki temu poszczególne symulacje pokrywają różne fragmenty przestrzeni konformacyjnej, umożliwiając zebranie reprezentatywnych danych dla całego zakresu interesujących wartości współrzędnej reakcji. Najprostszym i najczęściej stosowanym potencjałem w US jest potencjał harmoniczny. Zastosowanie dodatkowych potencjałów pozwala na reprezentatywne próbkowanie wysokoenergetycznych obszarów przestrzeni konformacyjnej wzdłuż wybranej współrzędnej reakcji [138, 139]. W każdym z okien symulacyjnych uzyskuje się rozkład prawdopodobieństwa znalezienia układu wzdłuż współrzędnej reakcji, zaburzony przez zastosowany dodatkowy potencjał $V(\xi)$:

$$p_b(\xi) = \frac{\int \delta(\xi(\mathbf{r}) - \xi) \exp\left(-\frac{U(\mathbf{r})+V(\xi)}{k_B T}\right)}{\int \exp\left(-\frac{U(\mathbf{r})+V(\xi)}{k_B T}\right)}, \quad (75)$$

gdzie $U(r)$ jest energią potencjalną układu, a p_b jest zaburzoną gęstością prawdopodobieństwa wzdłuż współrzędnej reakcji ξ . Ponieważ potencjał $V(\xi)$ jest stały dla danej wartości współrzędnej ξ , stosując odpowiednie przekształcenia, można otrzymać wzór na niezaburzony, równowagowy rozkład prawdopodobieństwa $p_u(\xi)$ wzdłuż współrzędnej ξ :

$$p_u(\xi) = p_b(\xi) \times \exp\left(\frac{V(\xi)}{k_B T}\right) \times \frac{\int \exp\left(-\frac{U(\mathbf{r})+V(\xi(\mathbf{r}))}{k_B T}\right)}{\int \exp\left(-\frac{U(\mathbf{r})}{k_B T}\right)} \quad (76)$$

Ostatni człon równania, który można interpretować jako wartość oczekiwaną czynnika $\exp\left(-\frac{V(\xi)}{k_B T}\right)$ względem rozkładu niezaburzonego, może być interpretowany jako dodatkowy wkład do energii swobodnej układu wynikający z zastosowania potencjału zaburzającego. Należy podkreślić, że nie jest to wartość oczekiwana samego potencjału $V(\xi)$ lecz $\exp\left(-\frac{V(\xi)}{k_B T}\right)$, co odpowiada nieliniowemu uśrednianiu wpływu zaburzenia. po rozkładzie niezaburzonym:

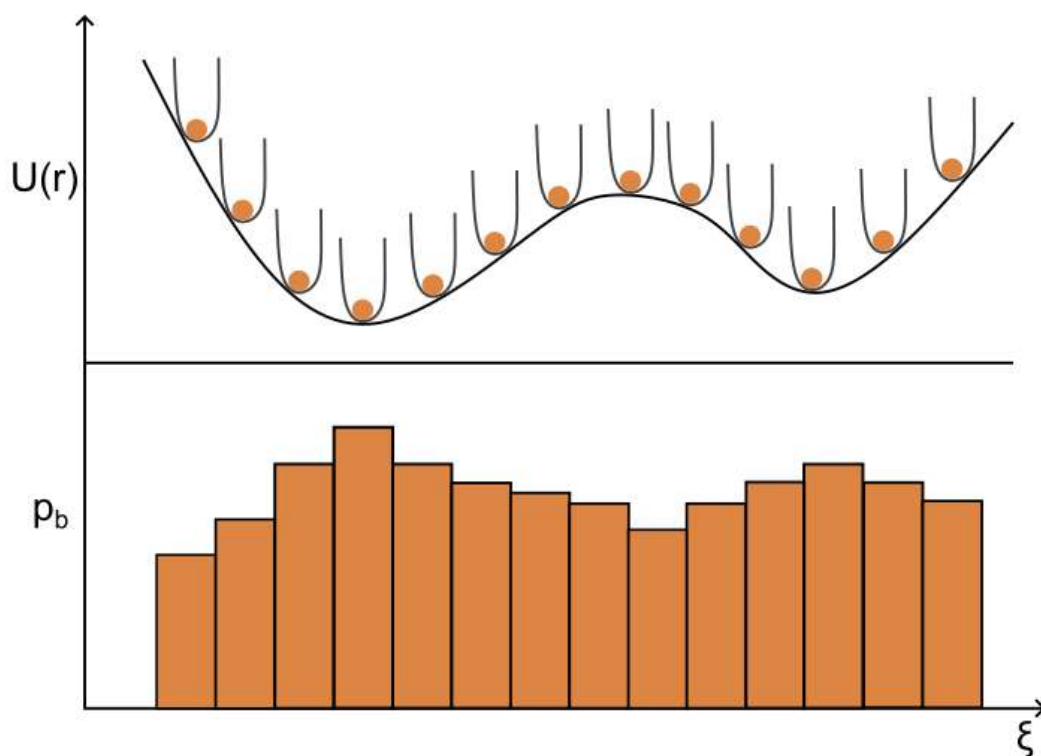
$$F = -k_B T \ln \langle \exp\left(-\frac{V(\xi)}{k_B T}\right) \rangle \quad (77)$$

Stosując takie oznaczenie, niezaburzony rozkład prawdopodobieństwa wzdłuż współrzędnej reakcji rekonstruujemy następująco:

$$p_u(\xi) = p_b(\xi) \times \exp\left(\frac{V(\xi) - F}{k_B T}\right) \quad (78)$$

W praktyce jedną z najczęściej stosowanych metod wyznaczania właściwej gęstości prawdopodobieństwa jest metoda ważonego histogramu (ang. *Weighted Histogram Analysis Method*, WHAM) [140, 141]. Jej algorytm pozwala zminimalizować błąd statystyczny wyznaczania PMF na podstawie ważonej sumy niezaburzonych funkcji gęstości z poszczególnych "okien" symulacji uzyskanych w oparciu o wyrażenie 77. Histogramy oznaczają tu zaburzone rozkłady prawdopodobieństwa wartości współrzędnej reakcji ξ generowane w poszczególnych oknach symulacyjnych. Histogramy z różnych okien są następnie łączone w celu uzyskania globalnego rozkładu prawdopodobieństwa dla całej interesującego nas zakresu współrzędnej reakcji.

Kluczowym elementem metody US jest odpowiednie rozmieszczenie potencjałów zaburzających, tak aby histogramy dla sąsiednich przedziałów współrzędnej reakcji nachodziły na siebie. Oznacza to, że wartości współrzędnej ξ w różnych oknach powinny się częściowo pokrywać, co umożliwia połączenie wyników z różnych okien. Taka konstrukcja pozwala na uzyskanie ciągłego i dobrze wypróbkowanego rozkładu prawdopodobieństwa wzdłuż współrzędnej reakcji, co z kolei umożliwia wiarygodne odtworzenie profilu energii swobodnej.



Rysunek 15: Schematyczna reprezentacja metody próbkowania parasolkowego (US). Zakres wartości współrzędnej reakcji ξ dzieli się na szereg nakładających się okien symulacyjnych. W każdym z nich układ jest próbkowany przy pomocy dodatkowego potencjału harmonicznego, który utrzymuje wartość ξ w pobliżu wybranego punktu. Na podstawie zebranych rozkładów prawdopodobieństwa w poszczególnych oknach rekonstruuje się globalny profil energii swobodnej jako funkcję współrzędnej ξ

Metadynamika

Inną techniką usprawnionego próbkowania użytą w niniejszej pracy jest metadynamika. Podobnie jak w metodzie próbkowania parasolkowego, wykorzystywany jest tu zewnętrzny potencjał działający wzdłuż wybranych współrzędnych reakcji opisujących badany proces. W tym przypadku dodawany potencjał jest jednak zależny od czasu. W odróżnieniu od próbkowania parasolkowego, w metadynamice nie jest wymagane wcześniejsze określenie konkretnych obszarów współrzędnej reakcji do intensywnego próbkowania. Zamiast tego, potencjał zaburzający jest budowany dynamicznie w trakcie symulacji, co pozwala układowi stopniowo opuszczać odwiedzane wcześniej konfiguracje i eksplorować nowe regiony przestrzeni konfiguracyjnej [142, 143, 144].

Symulacje dążą do wyznaczenia profilu energii swobodnej wzdłuż wybranej współrzędnej zgodnie z równaniem 72. W metadynamice stosuje się potencjał zależny od historii trajektorii, będący sumą krzywych Gaussa wzdłuż współrzędnej reakcji:

$$V_G(\xi, t) = \sum_{t'=1}^t \omega \exp \left(- \sum_{i=1}^d \frac{(\xi_i(\mathbf{r}) - \xi_i(\mathbf{r}(t')))^2}{2\sigma_i^2} \right), \quad (79)$$

gdzie ω oznacza szybkość, z jaką dodawany jest potencjał, d wymiar współrzędnej reakcji, $\xi_i(\mathbf{r})$ i -tą składową współrzędnej reakcji będącą funkcją położeń atomów $\mathbf{r}$, a σ_i odchylenie standardowe krzywej Gaussa dodawanej jako inkrement potencjału wzdłuż składowej ξ_i . Szybkość wzrostu potencjału dana jest przez stosunek wysokości inkrementu W oraz okresu τ , z jakim potencjał jest dodawany:

$$\omega = \frac{W}{\tau} \quad (80)$$

W odróżnieniu od próbkowania parasolkowego, metadynamika nie wymaga wcześniejszego podziału przestrzeni współrzędnej reakcji na osobne okna ani dokładnej wiedzy o położeniu barier energetycznych. Zewnętrzny potencjał jest w niej budowany adaptacyjnie w trakcie symulacji, co umożliwia systematyczne "wypychanie" układu z wcześniej odwiedzonych stanów i ułatwia eksplorację trudno dostępnych obszarów o wysokiej energii. Dzięki temu metadynamika umożliwia skuteczniejsze próbkowanie stanów energetycznie niekorzystnych oraz tych, które są trudno dostępne ze względu na obecność wysokich barier w przestrzeni współrzędnych kolektywnych.

Idea metadynamiki sprowadza się do okresowego dodawania wzdłuż współrzędnej reakcji zewnętrznego potencjału w postaci odpychających funkcji zaburzających (najczęściej o kształcie Gaussowskim), scentrowanych wokół bieżącego położenia układu w przestrzeni współrzędnych reakcji. Jeśli układ przebywa przez dłuższy czas w danym minimum energii swobodnej, kolejne funkcje odkładane w tym samym miejscu stopniowo podnoszą lokalny poziom energii. W rezultacie lokalne minimum staje się energetycznie mniej korzystne, a układ jest niejako wypychany z tego obszaru, co umożliwia mu eksplorację nowych rejonów współrzędnej reakcji. Mechanizm ten pozwala na sukcesywne pokonywanie barier energetycznych i odtworzenie przybliżonego profilu energii swobodnej w funkcji wybranych współrzędnych reakcji. W ten sposób metadynamika pozwala nie tylko na pokonywanie barier energetycznych, ale także na odkrywanie alternatywnych ścieżek przejścia między stanami, które mogą pozostać niewidoczne w klasycznych symulacjach.

Należy jednak zauważyć, że w praktyce dodany potencjał nie uezbieżnia się zwykle do (ujemnego) profilu energii swobodnej, lecz ma raczej tendencję do oscylowania wokół niego [142, 143, 145]. Aby zredukować problem tych oscylacji, można zastosować skalowanie dodawanego potencjału:

$$W = W_0 \exp \left(- \frac{V(\xi, t)}{k_B \Delta T} \right), \quad (81)$$

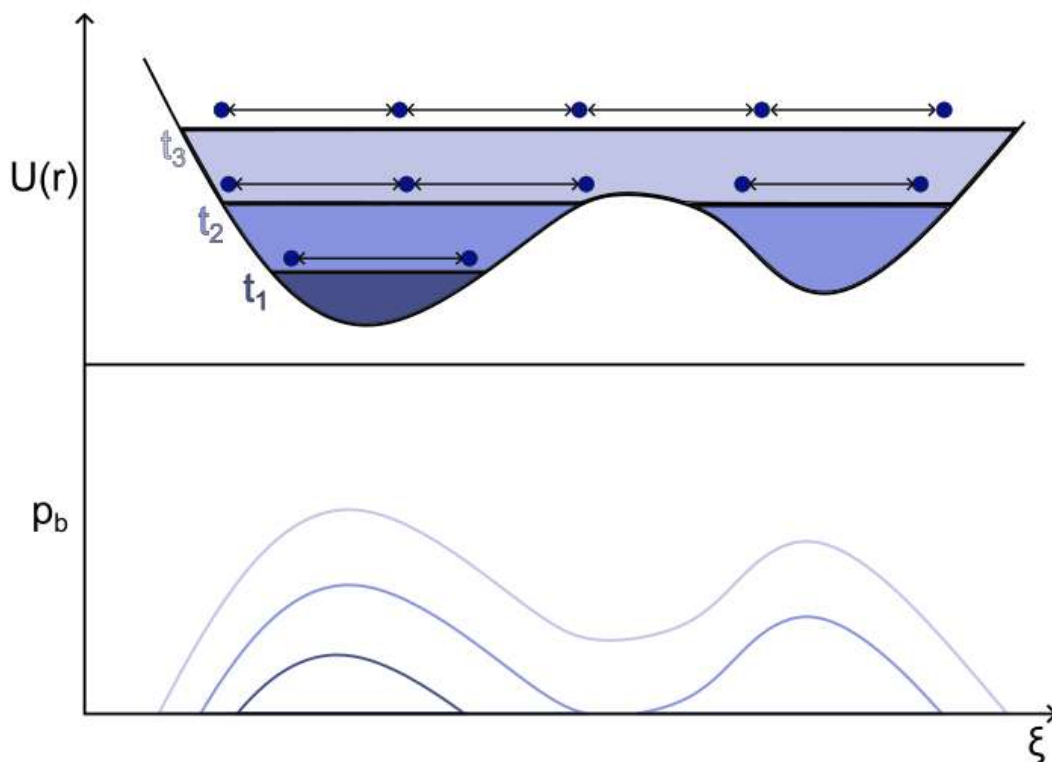
gdzie W_0 to początkowa wysokość potencjału, a ΔT to parametr kontrolujący szybkość zmniejszania się dodawanego potencjału. Dzięki takiemu zabiegowi uezbieżnienie po-

tencjału następuje zgodnie z:

$$V_G(\xi, t \rightarrow \infty) = -\frac{\Delta T}{\Delta T + T}G(\xi) + C \quad (82)$$

gdzie C jest stałą addytywną, a $G(\xi)$ jest profilem energii swobodnej. Często, aby oszacować stopień redukcji barier energii swobodnej wynikający z dodanego potencjału, zamiast parametru ΔT stosuje się czynnik skalujący potencjał (ang. *bias factor*), zdefiniowany jako:

$$\gamma = \frac{\Delta T + T}{T} \quad (83)$$



Rysunek 16: Schematyczna reprezentacja metody metadynamiki. Odpychające potencjały o kształcie rozkładu Gaussa są deponowane wzdłuż współrzędnej reakcji podczas symulacji MD, „podnosząc” powierzchnię energii swobodnej. Dzięki temu układ jest efektywnie "wypychany" z lokalnych minimów energii swobodnej, a regiony wysokoenergetyczne są także próbkowane. Kompletny profil energii swobodnej jest uzyskiwany jako ujemny logarytm sumy zdeponowanych potencjałów odpychających.

3.2 Procedury symulacyjne

3.2.1 Budowa systemów

W celu osiągnięcia założonych celów przeprowadziłam szereg symulacji dynamiki molekularnej osadzonego w błonie kompleksu F_o syntazy ATP. Struktury początkowe białka w tych symulacjach pochodziły z różnych organizmów i zostały przeze mnie pobrane z bazy danych struktur krystalicznych biomakrocząsteczek (ang. *Protein Data Bank*, PDB). Wszystkie struktury umieściłam w odpowiednio dobranych pudłach symulacyjnych, a białka zostały osadzone w błonach o składach skomponowanych na podstawie danych literaturowych dotyczących danego organizmu, przy użyciu programu CHARMM-GUI Membrane Builder [146]. Dokładne parametry zostały podane przy opisie każdego analizowanego systemu poniżej. Tak przygotowane układy zostały wysolwatowane modelowanym eksplicite roztworem wody z jonami chlorkowymi (Cl^-) i potasowymi (K^+) w stężeniu fizjologicznym (0,15 M) i neutralizującym ładunek całego układu.

Mitochondrialny kompleks F_o

Mitochondrialne białko F_o zostało wyodrębnione ze struktury dimeru kompleksu F_o pochodzenia drożdżowego uzyskanego techniką mikroskopii krioelektronowej (cryo-EM; PDB: 6B2Z) [10]. Błone skomponowałam z 151 cząsteczek 1-palmito-2-oleoilo-glicero-3-fosfocholino (POPC), 118 cząsteczek 1-palmito-2-oleoilo-fosfatydyloaminy (POPE) i 55 cząsteczek tetra-oleoilo-kardiolipiny (TOCL), co stanowiło odpowiednio 46.6, 36.4 i 17 % mol składu błony. Stężenia takie adekwatnie reprezentują skład wewnętrznej mitochondrialnej błony drożdży [147]. W pudle symulacyjnym o wymiarach $123.85 \times 123.85 \times 91.422$ Å umieściłam 25201 cząsteczek wody reprezentowanej z użyciem modelu TIP3P [148]. Wewnątrz *c*-pierścienia umieściłam po jednej cząsteczce POPC i POPE w górnym i dolnym listku błony, zgodnie z sugestiami z literatury [149].

Tak przygotowany układ został poddany dwuetapowej minimalizacji energii: w pierwszym kroku położenia wszystkich atomów białka były zamrożone, zaś w drugim wszystkie dodatkowe więzy zostały zdjęte. Następnie układ wstępnie zrelaksowałam przy użyciu protokołu CHARMM-GUI [150, 151, 152], prowadząc krótkie symulacje MD z coraz słabszymi więzami nałożonymi na atomy białka. W dalszej kolejności układ poddałam symulacji MD o długości 500 ns z przyłożonym potencjałem harmonicznym o stałej siłowej $1000 \text{ kJ}/(\text{mol} \cdot \text{nm}^2)$, utrzymującym układ blisko określonej geometrii opisanej wybranymi zmiennymi globalnymi, które odzwierciedlały istotne przesunięcia i obroty fragmentów kompleksu. Dzięki temu możliwe było ograniczenie nadmiernych odchyśleń od interesującego stanu referencyjnego. Następnie układ poddałam równoważeniu bez zewnętrznych potencjałów przez 700 ns. Struktury startowe do dalszych symulacji badających rotację kompleksu F_o wybrałam losowo z ostatnich 100 ns symulacji równowagowych.

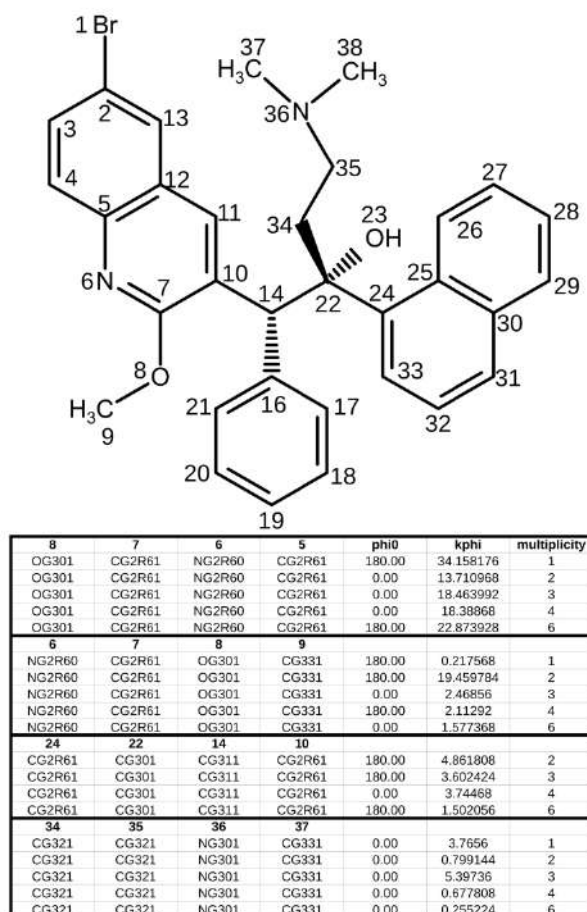
Poza wolnym kompleksem F_o przygotowałam również układ zawierający pełną strukturę kompleksu F_o ze związaną Olg. Powstała ona na podstawie struktury uzyskanej z użyciem kriomikroskopii elektronowej (PDB: 6CP5), pochodzącej z *Saccharomyces cerevisiae* [7]. Zawierała ona związaną Olg na powierzchni *c*-pierścienia. Skład błony był identyczny ze składem dla wolnego mitochondrialnego F_o . Zastosowałam ponownie model wody TIP3P, a system umieściłam w pudle o wymiarach $12,4082 \times 12,402 \times 9,108$ nm. Podobnie jak powyżej wykorzystałam parametry z pola siłowego CHARMM36m dla białka i lipidów. Parametry (z wyłączeniem ładunków cząstkowych) dla Olg uzyskałam przez analogię z uniwersalnego pola siłowego CHARMM Generalized Force Field (CGenFF) [153]. Na tak przygotowanym układzie wykonałam dwuetapową minimalizację, kroki protokołu CHARMM-GUI oraz relaksację 500 ns z potencjałem $1000 \text{ kJ}/(\text{mol}\cdot\text{nm}^2)$ przyłożonym do atomów szkieletu białka i 500 ns równoważenie systemu bez sił zewnętrznych.

Jednocześnie zbudowałam układ zawierający *c*-pierścień *Saccharomyces cerevisiae* ze związaną Olg na podstawie struktury pochodzącej z rentgenografii strukturalnej (PDB:4F4S) [97]. Procedura przygotowania układu odbyła się zgodnie z opisem powyżej. Wykorzystałam ten sam skład błony, model wody TIP3P oraz wykorzystałam parametry z pola siłowego CHARMM36m dla białka i lipidów, a także otrzymane uprzednio parametry Olg. System umieściłam w pudle o wymiarach $11,901 \times 11,901 \times 9,580$ nm. Wykonałam dwuetapową minimalizację, kroki protokołu CHARMM-GUI oraz relaksację 500 ns z potencjałem $1000 \text{ kJ}/(\text{mol}\cdot\text{nm}^2)$ przyłożonym do atomów szkieletu białka i 500 ns równoważenie systemu bez sił zewnętrznych.

Mykobakteryjny kompleks F_o

Jako strukturę początkową mykobakteryjnego kompleksu F_o , a dokładnie *c*-pierścienia, wykorzystałam strukturę krystaliczną białka pochodzącą z bakterii *Mycobacterium phlei* (*M.phlei*; PDB: 4V1F). Białko to wykazuje 83.7 % identyczności sekwencyjnej z białkiem pochodzącym z ludzkiego patogena *Mycobacterium tuberculosis* (*M.t.*) [21]. Struktura F_o z *M.phlei* rozwiązana została z rozdzielczością $1.70 \text{ \AA}$ i zawiera bedakilinę związaną na powierzchni *c*-pierścienia. Błonę skomponowałam zgodnie ze składem błony mykobakteryjnej, w taki sposób, że zawierała ona 184 cząsteczki palmitolo-10-metylo-stearylofosfatydyloinozytolu (PTPI), 22 cząsteczki plamitylo-oleoilo-fosfatydyloaminy (POPE) i 34 cząsteczki tetra-oleoilo-kardiolipiny (TOCL), co odpowiada 76,6, 9,2 i 14,2 % molowym[154]. Wewnątrz *c*-pierścienia umieściłam po dwie cząsteczki PTPI w górnym i dolnym listku błony. Układ umieściłam w prostopadłościennym pudle o wymiarach $103,629 \times 103,629 \times 109,560 \text{ \AA}$.

Do opisu energetyki układu wykorzystałam standardowe parametry dla białka, lipidów i jonów zgodnie z polem siłowym CHARMM36m [156]. Cząsteczki wody zareprezentowane zostały przy pomocy modelu TIP3P, a parametry dla cząsteczki bedakiliny



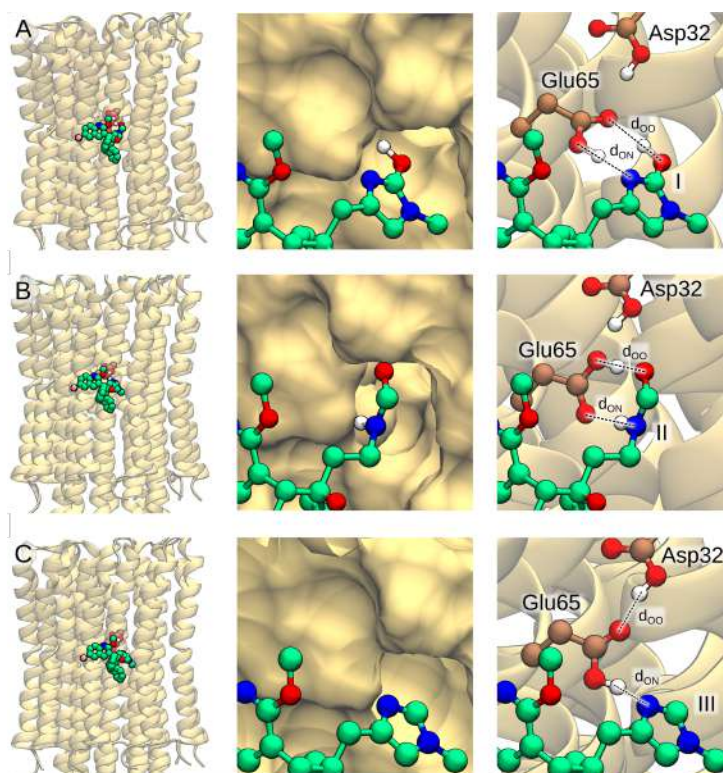
Rysunek 17: Uaktualnione parametry pola siłowego dla cząsteczki bedakiliny. Rysunek wykorzystany z pracy [155] na podstawie udzielonej zgody.

(z wyłączeniem ładunków cząstkowych) dobrane zostały przez analogię z uniwersalnego pola siłowego CHARMM Generalized Force Field (CGenFF) [153]. Dodatkowo, zaprezentowane na Rys. 17 cztery człony odpowiadające kątom torsyjnym w obrębie cząsteczki Bq zostały przeze mnie zoptymalizowane poprzez dopasowanie do profili energii rotacji obliczonych na poziomie MN12SX/6-31G z użyciem pakietu Gaussian [157, 158]. Ładunki cząstkowe Bq uzyskałam przez dopasowanie do potencjału elektrostatycznego obliczonego na tym samym poziomie teorii.

Dla tak przygotowanego układu przeprowadziłam, podobnie jak w przypadku białka mitochondrialnego, dwuetapową minimalizację opisaną powyżej oraz wstępne równoważenie za pomocą protokołu CHARMM-GUI. Następnie przeprowadziłam symulację z wykorzystaniem potencjału harmonicznego 1000 kJ/(mol·nm²) przyłożonego do atomów rdzenia białka przez 500 ns dla przygotowania struktury referencyjnej oraz równoważyłam bez żadnych dodatkowych potencjałów przez kolejne 500 ns.

Chcąc zbadać możliwości rozszerzenia spektrum działania bedakiliny (Bq), przeprowadziłam symulacje także dla zaproponowanych analogów tej cząsteczki. Powstały one poprzez zastąpienie grupy dimetyloaminowej Bq trzema różnymi ugrupowaniami: 2-hidroksy-

1-metyloimidazolem (I), kwasem formamidowym (II) oraz 1-metyloimidazolem (III). Otrzymane w ten sposób pochodne pozwoliły porównać wpływ modyfikacji tej części cząsteczki na sposób oddziaływania z *c*-pierścieniem kompleksu F_o . Struktury analogów zaprezentowałam na Rys. 31.



Rysunek 18: Struktury oraz miejsca wiązania trzech analogów Bq ze zmodyfikowaną grupą aminową: (I) 2-hydroksy-1-metylo-imidazolem, (II) kwasu formamidowym oraz (III) 1-metylo-imidazolem oraz dopasowanie przestrzenne inhibitorów do powierzchni *c*-pierścienia mykobakteryjnego pochodzącego ze struktury *M.phlei*(PDB: 4V1F)

Poza układem zawierającym Bq w kompleksie z izolowanym *c*-pierścieniem przygotowałam również układ zawierający pełną strukturę kompleksu F_o ze związaną Bq. Powstała ona na podstawie struktury uzyskanej z użyciem kriomikroskopii elektronowej (PDB: 7JGC), pochodzącej z *Mycobacterium smegmatis* (*M.s.*). Zawierała ona związaną bedakilinę na powierzchni *c*-pierścienia. Skład błony był identyczny ze składem dla samego *c*-pierścienia, zastosowałam także model wody TIP3P, a system umieściłam w pudle o wymiarach $12,248 \times 12,248 \times 11,276$ nm. Jak wyżej wykorzystałam parametry z pola siłowego CHARMM36m dla białka i lipidów oraz bazowałam na uprzednio przygotowanej parametryzacji bedakiliny.

Podobnie jak w obu powyższych przypadkach wykonałam dwuetapową minimalizację, kroki protokołu CHARMM-GUI oraz relaksację 500 ns z potencjałem $1000 \text{ kJ}/(\text{mol}\cdot\text{nm}^2)$ przyłożonym do atomów szkieletu białka i 500 ns równoważenie systemu bez sił zewnętrznych.

3.2.2 Symulacje dynamiki molekularnej

Wszystkie symulacje MD zarówno białka F_o z mitochondrium, jak i mykobakterii, zostały przeprowadzone przy użyciu programu GROMACS [159] w warunkach izotermiczno-izobarycznych (NPT). Temperatura w trakcie wszystkich symulacji wynosiła 310 K i była utrzymywana za pomocą termostatu Nose-Hoovera [160]. Ciśnienie było utrzymywane pólizotropowo na poziomie 1 bara przy użyciu algorytmu Parrinello-Rahmana [161], a okresowe warunki brzegowe (PBC) zastosowane zostały we wszystkich trzech kierunkach kartezjańskich. Oddziaływania elektrostatyczne były wyznaczone z wykorzystaniem algorytmu (ang.) *Particle Mesh Ewald* (PME) z promieniem odcięcia w przestrzeni rzeczywistej 1,2 nm i odstępem siatki FFT 0,12 nm [162]. Oddziaływania dyspersyjne opisane były z pomocą potencjału Lennarda-Jonesa z promieniem odcięcia 1,2 nm i schematem przełączania sił w zakresie od 1,0 do 1,2 nm. Długości wiązań kowalencyjnych z udziałem atomu wodoru w przypadku białka, cząsteczek leku i lipidów zostały zamrożone za pomocą algorytmu P-LINCS [163], natomiast dla wody wiązania O-H oraz kąt H-O-H zostały zamrożone za pomocą algorytmu SETTLE [131]. Równania ruchu były całkowane metodą żabiego skoku Verleta z krokiem czasowym 2 fs [129].

Profile energii swobodnej dla rotacji c -pierścienia

Zmiany energii swobodnej w wyniku rotacji c -pierścienia względem podjednostki a zbadalam za pomocą metody próbkowania parasolkowego (US). Jako współrzędną reakcji przyjąłem kąt obrotu c -pierścienia wokół stałej pionowej osi przechodzącej przez jego środek (kąt θ). Obrót c -pierścienia o jedną podjednostkę dla mitochondrialnego kompleksu F_o odpowiada obrotowi o 36° (c -pierścień składa się z 10 podjednostek), natomiast dla mykobakteryjnego kompleksu o 46° (9 podjednostek c -pierścienia). Dla drożdżowego układu przygotowałam wraz (z pomocą studenta A. Marciniaka z naszej grupy badawczej) 13 okien symulacyjnych oddalonych od siebie równomiernie o 3° w których układ utrzymywany był za pomocą potencjału opisanego w pracy Kutznera et al. [164] o stałej siłowej $0.5 \text{ kJ}/(\text{mol}\cdot\text{nm}^2)$. W przypadku mykobakteryjnego systemu zastosowałam 22 okna symulacyjne oddalone od siebie o 2° i utrzymywane w sposób analogiczny do systemu drożdżowego. Początkowe położenia atomów wyekstrahowałam z symulacji wymuszonej rotacji c -pierścienia względem podjednostki a . Symulacje te przeprowadziłam ze stałą prędkością kątową $0.36^\circ/\text{ns}$ dla drożdżowego kompleksu F_o , oraz $0.40^\circ/\text{ns}$ dla mykobakteryjnego. W obu przypadkach umożliwił to przyłożony potencjał izotropowy o stałej siłowej $500 \text{ kJ}/(\text{mol}\cdot\text{nm}^2)$. Aby zapobiec obracaniu się całego kompleksu F_o , atomy rdzenia osadzonej w błonie podjednostki b były harmonicznie utrzymywane za pomocą stałej siłowej $1000 \text{ kJ}/(\text{mol}\cdot\text{nm}^2)$. Każde okno symulacyjne US dla rotacji mitochondrialnego kompleksu F_o poddane zostało symulacji MD przez 600 ns, z czego pierwsze 200 ns zostało pominięte

w analizie. W przypadku kompleksu mykobakteryjnego symulacje trwały 700 ns, a pierwsze 200 ns zostało potraktowane jako równoważenie układu. Profile energetyczne rotacji wyznaczyłam przy użyciu wielostanowego wariantu metody Bennetta (ang. multistate Bennett acceptance ratio; MBAR) zaimplementowanej w programie pymbar [165].

Profile energii swobodnej dla wiązania Bq z *c*-pierścieniem

Profile energii wiązania Bq do powierzchni *c*-pierścienia również uzyskałam za pomocą klasycznych symulacji MD z wykorzystaniem techniki US. Współrzedną reakcji d_{COM} zdefiniowałam jako odległość pomiędzy centrum masy głównego łańcucha *c*-pierścienia a centrum masy ciężkich atomów Bq. W celu wypróbkowania zachowania układu wzdłuż tej współrzednej zastosowałam 21 równoodległych okien symulacyjnych oddzielonych o 0,1 nm i utrzymanych potencjałem harmonicznym o stałej siłowej 500 kJ/(mol·nm²), pokrywając zakres współrzednej od 2,5 do 4,6 nm. Początkowe położenia w każdym oknie wybrałam na podstawie nierównowagowej symulacji, podczas której Bq było poddane oddysocjowaniu z powierzchni białka przez 500 ns za pomocą ruchomego potencjału harmonicznego o stałej siłowej 500 kJ/(mol·nm²). Dla każdego okna US przeprowadziłam 600 ns symulacji, a pierwsze 200 ns zostało pominięte w analizach jako równoważenie. Profile energii swobodnej dla wiązania Bq z powierzchnią białka otrzymałam przy użyciu metody ważonych histogramów (WHAM) [166].

Profile energii swobodnej dla wiązania Olg z *c*-pierścieniem

Profile energii wiązania Olg do powierzchni *c*-pierścienia również uzyskałam za pomocą klasycznych symulacji MD z wykorzystaniem techniki US. Współrzedną reakcji d_{COM} zdefiniowałam jako odległość pomiędzy centrum masy głównego łańcucha *c*-pierścienia a centrum masy ciężkich atomów Olg. W celu wypróbkowania zachowania układu wzdłuż tej współrzednej zastosowałam 21 równoodległe okna symulacyjne oddzielonych o 0,1 nm i utrzymanych potencjałem harmonicznym o stałej siłowej 500 kJ/(mol·nm²), pokrywając zakres współrzednej od 2,5 do 4,5 nm. Początkowe położenia w każdym oknie wybrałam na podstawie nierównowagowej symulacji, podczas której Olg było poddane oddysocjowaniu z powierzchni białka przez 500 ns za pomocą ruchomego potencjału harmonicznego o stałej siłowej 500 kJ/(mol·nm²). Dla każdego okna US przeprowadziłam 600 ns symulacji, a pierwsze 200 ns zostało pominięte w analizach jako równoważenie. Profile energii swobodnej dla wiązania Bq z powierzchnią białka otrzymałam przy użyciu metody ważonych histogramów (WHAM) [166].

3.2.3 Symulacje dynamiki molekularnej QM/MM

Symulacje transferu protonu z wykorzystaniem DFTB

Początkową strukturę do symulacji QM/MM z wykorzystaniem DFTB, czyli półempirycznego wariantu DFT, wybrałam z równowagowej symulacji kompleksu F_o (PDB: 6B2Z [10]) ze zdeprotonowaną resztą kwasu glutaminowego c -pierścienia w półkanale uwalniającym oraz zdeprotonowaną resztą kwasu glutaminowego w półkanale wiążącym. Zdecydowałam się na wybór klatki startowej o takim stanie protonacji, ponieważ celem analizy było prześledzenie mechanizmu przeniesienia protonu na c -pierścień w półkanale wiążącym. Rejon kwantowy układu obejmował łańcuch boczny reszty Glu c -pierścienia (akceptor protonu), łańcuch boczny Glu podjednostki a (donor protonu), łańcuchy boczne aminokwasów polarnych Asn180 i Gln230 oraz cząsteczki wody pomiędzy donorem i akceptorem wybrane jako wszystkie cząsteczki wody w odległości nie większej niż 5 Å od centrum układu QM. W sumie w układzie kwantowym znalazły się 63 atomy, które były traktowane za pomocą metody DFTB3 z zestawem parametrów 3OB[167]. Zastosowano implementację korekty BJ D3 [168], aby zrekompensować brakujący opis oddziaływań dyspersyjnych w DFTB. Pozostałą część układu opisałam za pomocą pola siłowego CHARMM36m [156]. Do rozwiązania równań ruchu Newtona wykorzystywałam algorytm *leap-frog* z krokiem czasowym 0,5 fs. Temperatura i ciśnienie utrzymywane były przy pomocy termostatu Nosé-Hoovera i barostatu Parrinello-Rahmana. Symulacje QM/MM przeprowadzono przy użyciu specjalnej wersji Gromacs 5.0 z implementacją DFTB3 [169] w połączeniu z pluginem Plumed 2.1.1 [170]. Układ poddano równoważeniu, a następnie przeprowadzono symulację wymuszonego przeniesienia protonu z donora (Glu223) na akceptor (Glu59) z zastosowaniem potencjału harmonicznego. Na podstawie tej trajektorii wybrałam struktury startowe dla wyznaczenia profilu energii swobodnej dla procesu przeniesienia protonu w półkanale wiążącym z wykorzystaniem US. Uzyskany profil odpowiadał kątowi obrotu c -pierścienia równemu 0° (czyli stabilnej strukturze obserwowanej w cryo-EM). W tym celu wykorzystywałam metodę zwielokrotnionej metadynamiki z (ang. *multiple walker metadynamics*). Do opisu transferu protonu wykorzystywałam współrzędną opartą na (zmodyfikowanej) współrzędnej centrum nadmiarowego ładunku (ang. *modified center of excess charge*, mCEC) [171]:

$$\xi = \sum_{i=1}^{N_H} \mathbf{r}^{H_i} - \sum_{j=1}^{N_X} w^{X_j} \mathbf{r}^{X_j} - \sum_{i=1}^{N_H} \sum_{j=1}^{N_X} f_{sw} \left(d^{H_i, X_j} \right) \left(\mathbf{r}^{H_i} - \mathbf{r}^{X_j} \right). \quad (84)$$

Pierwszy człon równania 84 jest sumą współrzędnych wszystkich atomów wodoru w cząsteczkach zaangażowanych w transfer $\mathbf{r}^{H_i}$, zaś drugi człon jest ważoną sumą położeń $\mathbf{r}^{X_j}$ wszystkich atomów mogących koordynować wodór i biorących udział w procesie translokacji protonu w półkanale wiążącym (przy czym waga w^{X_j} jest liczbą atomów wodoru koordynujących X_j w najmniej sprotonowanej konfiguracji). Ostatni człon służy

jako poprawka biegnąca przez wszystkie odległości między wodorami i koordynującymi je atomami (d^{H_i, X_j}); $f_{sw}(d)$ to funkcja przełączająca zdefiniowana w następujący sposób:

$$f_{sw}(d) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{d - r_{sw}}{d_{sw}}\right)}, \quad (85)$$

gdzie $r_{sw} = 0,125$ nm oraz $d_{sw} = 0,006$ nm są parametrami empirycznymi, które kontrolują stromość i scentrowanie funkcji przełączającej na skali długości wiązania. Zmienna wektorowa ξ reprezentuje przestrzenną lokalizację przenoszonego nadmiarowego ładunku (np. protonu w mechanizmie Grotthussa). ξ może zostać przekształcona w wielkość skalarną ζ poprzez uwzględnienie odległości $d_{\xi,D}$ między mCEC i początkowym donorem protonu D, oraz odległości $d_{\xi,A}$ między mCEC i końcowym akceptorem protonu A:

$$\zeta = \frac{d_{\xi,D} - d_{\xi,A}}{d_{\xi,D} + d_{\xi,A}}. \quad (86)$$

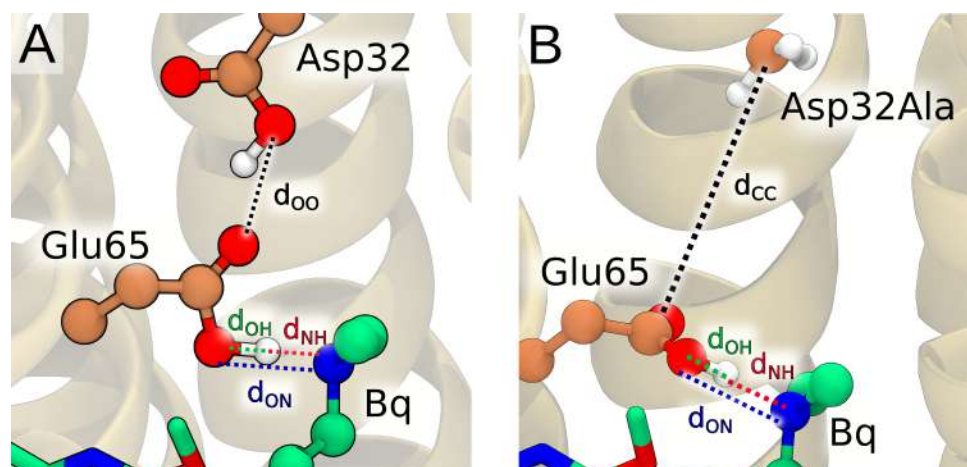
Przeniesienie protonu jest określone w zakresie od $\zeta = 1$ dla protonu związanego z donorem do $\zeta = -1$ dla protonu związanego z akceptorem. W moim przypadku współrzędna mCEC została użyta do opisu procesu przeniesienia protonu od Glu podjednostki a do Glu59 *c*-pierścienia i obejmowała wszystkie cztery cząsteczki wody QM lokujące się pomiędzy tymi resztami. Wszystkie cząsteczki wody w regionie QM oraz atomy tlenu grup karboksylowych potraktowałam jako możliwe miejsca koordynacji protonów. Przeniesienie nadmiaru ładunku zostało zmapowane względem atomu węgla γ obu kwasów glutaminowych przy użyciu wielkości z równania 86.

Parametry metadynamiki zostały dobrane tak, aby zapewnić równowagę pomiędzy dokładnością a efektywnością próbkowania przestrzeni konformacyjnej. Do budowy potencjału dodatkowego zastosowałam rozkład Gaussa o szerokości 0,05 jednostki wzdłuż każdej współrzędnej reakcji ζ i wysokości początkowej równej 0,6 kcal/mol, które dodawano co 1000 kroków dynamiki molekularnej. Symulacje prowadziłam w schemacie temperowanej metadynamiki z czynnikiem bias równym 60, przy temperaturze 300 K. W celu przyspieszenia zbieżności użyto 20 równoległych symulacji, które wymieniały informacje o potencjale dodatkowym co 1000 kroków. Zakres przestrzeni przeszukiwanej dla współrzędnych kolektywnych wynosił $-1 \leq \zeta \leq 1$.

Symulacje AIMD Bq i jej analogów w kompleksie z mykobakteryjnym *c*-pierścieniem

Symulacje QM/MM dynamiki molekularnej *ab initio* (AIMD) mykobakteryjnego *c*-pierścienia ze związaną na powierzchni Bq i jej analogami przeprowadziłam w błonie o składzie opisanym powyżej. Do obliczeń QM/MM wykorzystałam program NAMD 2.14 [172, 173] sprzężony z programem do obliczeń kwantowych ORCA 4.2 [174]. Rejon układu, który potraktowałam na poziomie kwantowym, obejmował dwa łańcuchy boczne

krytycznych reszt kwasowych aminokwasów *c*-pierścienia *M.t.*, czyli E65 i D32 oraz grupę dimetyloaminową Bq. W efekcie w systemie kwantowym znalazły się 32 atomy. Natomiast energetykę całej reszty układu opisałam przy pomocy pola siłowego CHARMM36m. Wykonałam również mutację reszty D32 na alaninę (D32A) w celu sprawdzenia jej znaczenia dla mechanizmu działania leku. W tym przypadku układ kwantowy obejmował 29 atomów. Oba systemy kwantowe dla Bq zaprezentowano na rysunku 19. Dla analogów Bq w obrębie podukładów kwantowych znalazły się zmodyfikowane grupy funkcyjne.



Rysunek 19: Reprezentacja CPK przedstawiająca podukłady QM w symulacjach AIMD kompleksów *c*-pierścienia typu dzikiego (A) oraz jego wariantu D32A (B) w kompleksie z Bq. Dla przejrzystości rysunku niepolarne atomy wodoru zostały pominięte. Dodatkowo zaznaczono kluczowe w dalszej analizie odległości. Rysunek wykorzystany z pracy [155] na podstawie udzielonej zgody.

Siły w systemie QM obliczyłam przy użyciu metody Kohna-Shama z funkcjonałem hybrydowym ω B97X-D3 [175] w połączeniu z zestawem bazy def2-SVP dla etapów wymagających mniejszego nakładu obliczeniowego oraz z zestawem def2-TZVP w przypadku obliczeń wymagających wyższej dokładności [176]. Dla usprawnienia prowadzonej symulacji wykorzystałam aproksymację rozkładu jedności (RIJ) w połączeniu z pomocniczym zestawem bazowym def2/J do oszacowania całek wymiennych Hartree-Focka z zastosowaniem półnumerycznego algorytmu łańcucha sfer (COSX) [177]. System traktowany na poziomie MM opisałam za pomocą pola siłowego CHARMM36m [156] dla białek, Bq, lipidów i jonów oraz modelu TIP3P dla wody. Aby uniknąć "wiszących wiązań" między systemami QM i MM i uzupełnić wiązania kowalencyjne, użyłam atomów łączących (ang. *link atoms*, LA) w postaci wodoru z domyślnym rozkładem ładunku [172]. Zastosowałam okresowe warunki brzegowe w trzech kierunkach. Dla oddziaływań elektrostatycznych między systemami QM i MM wykorzystałam osadzanie elektrostatyczne (ang. *electrostatic embedding*), w którym ładunki cząstkowe systemu MM otaczające region QM zostały przekazane do programu kwantowego ORCA przy użyciu domyślnego promienia odcięcia [172].

Oddziaływania elektrostatyczne dalekiego zasięgu między regionami MM i QM, a także elektrostatyka MM, zostały obliczone przy użyciu metody PME z odcięciem przestrzeni rzeczywistej 1.2 nm i skokiem siatki 1.0 nm. Częstkowe ładunki QM były aktualizowane w każdym pojedynczym kroku. Potencjał Lennarda-Jonesa z promieniem odcięcia 1.2 nm został użyty do opisu oddziaływań van der Waalsa w obrębie systemu QM oraz na granicy QM-MM.

Symulacje przeprowadziłam w warunkach izotermiczno-izobarycznych (NPT), utrzymując temperaturę na poziomie 310 K przy użyciu dynamiki Langevina ze współczynnikiem tłumienia 50 ps^{-1} . Ciśnienie utrzymywałam na poziomie 1 bar przy użyciu metody tłokowej Langevina z okresem oscylacji 0.2 ps i skalą czasową tłumienia 0.1 ps. Równania ruchu zostały scałkowane przy użyciu algorytmu prędkościowego Verleta z krokiem czasowym 0.5 fs, a całkowity czas symulacji wynosił 80 ps (dla Bq) i 10 ps (dla analogów Bq).

Wyznaczenie profili energii swobodnej dla transefru protonu w kompleksie F_o

Profile energii swobodnej dla transferu protonu między grupą karboksylową reszty E65 *c*-pierścienia i grupą dimetyloaminową Bq wyznaczyłam z wykorzystaniem dynamiki molekularnej ab initio w wariacie QM/MM w połączeniu z metodą próbkowania parasolkowego. Obliczenia wykonałam zarówno dla białka typu dzikiego (ang. *Wild Type*, WT) jak i jego mutantu D32A. Zastosowałam taki sam poziom teorii, protokół symulacyjny i ustawienia jak opisano powyżej w symulacjach równowagowych kompleksu Bq z białkiem F_o. W symulacjach US współrzędną reakcji była odległość między atomem wodoru a tlenem reszty karboksylowej E65 d_{OH} . Zarówno dla wariantu WT, jak i D32A przygotowałam po 13 okien symulacyjnych w zakresie współrzędnej 1.0-1.6 nm, oddzielonych o 0.05 nm i utrzymywanych potencjałem harmonicznym ze stałą siłową $500 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{nm}^2)$. Początkowe konfiguracje układu w każdym z okien symulacyjnych w obu wariantach wybrałam na podstawie symulacji wymuszonej translokacji protonu z E65 na azot grupy dimetyloaminowej Bq z wykorzystaniem ruchomego potencjału harmonicznego ze stałą siłową $1250 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{nm}^2)$. Każde okno symulacyjne US symulowałam przez 90 ps, a pierwsze 40 ps potraktowałam jako równowagę układu. Profile energii swobodnej obliczyłam przy użyciu metody WHAM [166].

Energie wiązania Bq oraz analiza wiązania wodorowego Bq-*c*-pierścień

Aby obliczyć energię wiązania, BE , wynikającą z obecności wiązania wodorowego między grupą dimetyloaminową Bq a E65 *c*-pierścienia (w obecności lub nieobecności D32), został użyty następujący wzór:

$$BE = E_{\text{kompleks}} - (E_{\text{Bq}} + E_{\text{białko}}) \quad (87)$$

W tym przypadku E_{kompleks} jest energią kompleksu uwzględniającą cały system QM, E_{Bq} jest energią grupy dimetyloaminowej Bq, a $E_{\text{białko}}$ jest energią pary aminokwasów E65/D32 (w przypadku WT) lub samego E65 (dla wariantu D32A). Poszczególne energie zostały oszacowane przy użyciu teorii funkcjonału gęstości (DFT) za pomocą programu Gaussian 16 [158] i uśrednione dla 100 losowych okien symulacyjnych MD wyekstrahowanych z równowagowych symulacji AIMD. Układy traktowane kwantowo w ramach statycznych obliczeń QM/MM zostały wyodrębnione z całego symulowanego układu, a powłoki elektronowe zamknięto atomami wodoru. W celu określenia podatności energii wiązania na parametry obliczeń wykorzystano trzy różne funkcjonały korelacyjno-wymienne, tj. B3LYP [23, 178], ω B97XD [179] i M06-2X [180] oraz dwa różne zespoły funkcji bazowych, tj. 6-311++g(d,p) i 6-31g(d). Użyto korekty dyspersji D3 Grimme’a dla B3LYP i M06-2X oraz skorygowano energię wiązania o błąd superpozycji zestawu podstawowego (ang. *Basis Set Superposition Error*, BSSE).

Obliczone gęstości elektronowe w punktach krytycznych przy pomocy oprogramowania DAMQT2.0 [181]. Wartości uśredniono dla 100 klatek symulacyjnych MD wybranych losowo na podstawie symulacji równowagowych QM/MM.

4 Wyniki i dyskusja

4.1 Mechanizm działania kompleksu F_o syntazy ATP

4.1.1 Mechanizm rotacji w obrębie kompleksu F_o

Zadaniem, które postawiłam przed sobą, było zbadanie i wyjaśnienie molekularnego mechanizmu rotacji w obrębie kompleksu F_o syntazy ATP. Dotychczasowe analizy tego mechanizmu, omówione przeze mnie we wprowadzeniu, okazały się niewystarczające, zarówno ze względu na ograniczenia poziomu stosowanej teorii [65], jak i z powodu niedoboru odpowiednich struktur krystalicznych i danych eksperymentalnych [5]. Wcześniejsze badania opierały się głównie na modelach teoretycznych oraz strukturach bakteryjnych kompleksów syntazy ATP, które różnią się od form mitochondrialnych (między innymi wielkością c -pierścienia). Dotychczasowe analizy koncentrowały się zazwyczaj na ogólnym schemacie działania syntazy ATP, zakładając model "karuzeli", w którym obrót c -pierścienia względem podjednostki a prowadzi do translokacji protonów. Tego rodzaju ujęcie pozwalało opisać sprzężenie pomiędzy przepływem protonów a ruchem rotacyjnym, ale nie wyjaśniało, dlaczego rotacja w warunkach fizjologicznych zachodzi wyłącznie w jednym kierunku. Wiele wcześniejszych prac nie potrafiło jednoznacznie określić dokładnego przebiegu kanałów protonowych ani położenia kluczowych reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za transfer protonów i sprzężenie tego procesu z ruchem rotacyjnym. Brakowało również danych o dynamicznych zmianach konformacyjnych podczas cyklu katalitycznego. Ze względu na brak wysokorozdzielczych struktur mitochondrialnego kompleksu F_o , większość analiz bazowała na domniemaniach i porównaniach do bakteryjnych odpowiedników (np. z *Escherichia coli*), co ograniczało możliwość ekstrapolacji wyników na organizmy eukariotyczne [97, 98, 182]. Przełomem w tej dziedzinie okazała się identyfikacja pełnej struktury mitochondrialnego kompleksu F_o pochodzenia drożdżowego *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 6B2Z) [8] za pomocą mikroskopii krioelektronowej. Uzyskana struktura stanowi znakomity punkt wyjścia do dalszych, bardziej szczegółowych analiz mechanizmu rotacji oraz sposobu, w jaki energia z gradientu protonowego jest przekształcana w energię mechaniczną napędzającą syntezę ATP. We współpracy z Antonim Marciniakiem, studentem biotechnologii Politechniki Gdańskiej, podjęłam się ustalenia mechanizmu leżącego u podstaw jednokierunkowej rotacji c -pierścienia wywołanej transportem protonów. Za wykonanie większości tych symulacji rotacji c -pierścienia odpowiedzialny był Antoni, pracujący pod wyznaczonym przeze mnie kierunkiem. Na tej podstawie zaproponowałam mechanizm obrotu w ramach kompleksu F_o , identyfikując kluczowe reszty biorące w nim udział.

Zasadniczą kwestią, którą starałam się wyjaśnić, był mechanizm, dzięki któremu transfer protonów w obrębie półkanałów kompleksu F_o wiąże się z rotacją c -pierścienia. Wia-

domo, że rotacja ta ma charakter jednokierunkowy – w warunkach fizjologicznych obrót w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara sprzężony jest z syntezą ATP, natomiast kierunek przeciwny odpowiada hydrolizie ATP w kompleksie F_1 . Sama kierunkowość nie może jednak wynikać z termodynamiki, ponieważ z symetrii c -pierścienia wynika, że przesunięcie o 36° w lewo lub w prawo prowadzi do takiego samego stanu równowagi. Oznacza to, że źródła asymetrii należy szukać w dynamice procesu – a więc w różnicach w wysokości barier energetycznych i w sposobie, w jaki transfer protonów jest sprzężony z ruchem rotacyjnym c -pierścienia względem podjednostki a .

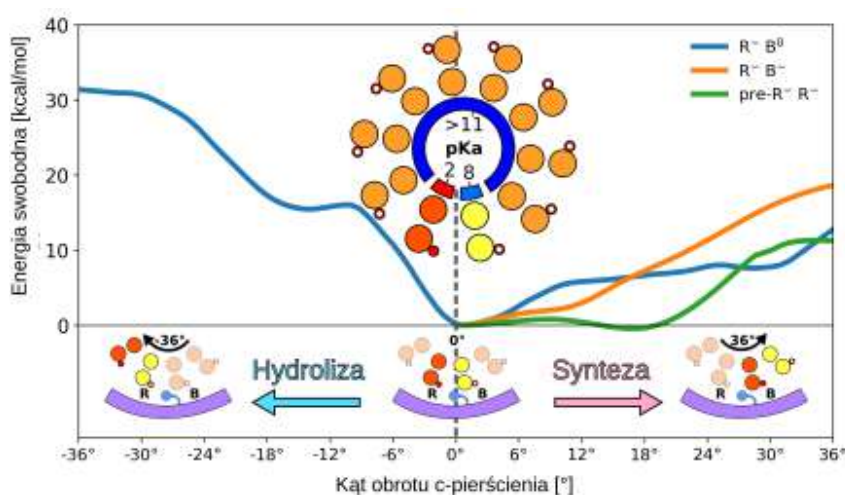
Aby to zbadać, przeprowadziliśmy zestaw pełnoatomowych symulacji MD, na podstawie których określiłam zmiany energii swobodnej towarzyszące obrotowi c -pierścienia o jeden monomer w stosunku do nieruchomej podjednostki a . Ze względu na symetrię c -pierścienia w drożdżowej syntazie ATP (składającego się z 10 podjednostek), przyjąłam, że pojedynczy krok rotacyjny wynosi 36° , co odpowiada przemieszczeniu o jedną podjednostkę względem podjednostki a . Symetrię tę wykorzystałam do przeprowadzenia obliczeń w obu kierunkach rotacji. Analiza obu scenariuszy pozwoliła określić, czy różnice w energetyce i dynamice procesu protonowego prowadzą do asymetrii funkcjonalnej, która mogłaby tłumaczyć obserwowany *in vivo* jednokierunkowy charakter rotacji.

Dodatkowo, aby zrealizować precyzyjniejszą analizę mechanizmu rotacji sprzężonego z transferem protonów, rozważyłam różne możliwe konfiguracje protonacji kluczowych reszt glutaminianowych (Glu), które znajdują się w sąsiedztwie półkanału wiążącego oraz półkanału uwalniającego. Konfiguracje te były wybierane na podstawie przewidywanej roli poszczególnych reszt: Glu w półkanale wiążącym pełniła rolę akceptora protonu, natomiast Glu w półkanale uwalniającym działała jako donator. Dzięki temu możliwe było zbadanie, jak różne stany protonacji tych reszt wpływają na stabilność konformacji rotacyjnych c -pierścienia oraz przebieg kluczowych etapów sprzężenia transferu protonów z jego obrotem.

W celu przygotowania różnych wariantów stanów początkowych do przeprowadzenia symulacji, skorzystałam z wykonanych przez Antoniego Marciniaka przewidywań wartości pK_a kluczowych reszt kwasu glutaminowego w podjednostkach c . Wartości te dla poszczególnych reszt Glu c -pierścienia zostały zaprezentowane na Rys. 20. Obliczenia te wykazały wyraźne różnice w wartościach pK_a : w półkanale wiążącym (B) wartość pK_a wynosiła $8,4 \pm 0,3$, natomiast w półkanale uwalniającym (R) była znacznie niższa i wynosiła $1,9 \pm 0,2$. Tak duża różnica wskazuje na znacząco odmienne mikrośrodowisko elektrostatyczne w tych dwóch regionach kompleksu F_o , wynikające m.in. z lokalnego rozmieszczenia ładunków, dostępności cząsteczek wody oraz kontaktu z innymi resztami. Na podstawie tych danych przyjąłam, że w stanie równowagowym, odpowiadającym warunkom fizjologicznym i sprzyjającym rotacji w kierunku syntezy ATP, reszta glutaminowa znajdująca się w półkanale wiążącym powinna być w stanie sprotonowanym (czyli obojętnym), na-

tomiaś ta znajdująca się w półkanale uwalniającym – w stanie zdeprotonowanym (czyli naładowanym ujemnie). Taki stan protonacji został przyjęty jako podstawowy wariant do analizy energetyki procesu rotacji.

W celu zbadania wpływu stanu protonacji na przebieg i energetykę rotacji, przeprowadziłam również symulacje dla alternatywnego wariantu, w którym obie reszty glutaminowe – zarówno w półkanale B, jak i w półkanale R – znajdowały się w stanie zdeprotonowanym. Porównanie wyników z obu przypadków pozwoliło mi ocenić, jak zmiana stanu protonacji wpłynie na stabilność poszczególnych konformacji w trakcie rotacji, na wysokość barier energetycznych oraz preferencję kierunku obrotu. Takie podejście umożliwiło mi ustalenie, że konfiguracja, w której reszta Glu w półkanale B pozostaje sprotonowana, a w półkanale R zdeprotonowana, sprzyja rotacji w kierunku zgodnym z syntezą ATP, podczas gdy konfiguracja odwrotna prowadzi do zwiększenia bariery energetycznej i utrudnia rotację w tym kierunku. W ten sposób potwierdziłam funkcjonalne znaczenie asymetrii protonacji w mechanizmie działania syntazy ATP. Wyniki analiz przedstawiłam na Rys. 20.



Rysunek 20: Profile energii swobodnej dla rotacji kompleksu F_0 w kierunku hydrolizy i syntezy o jedną podjednostkę c -pierścienia (obróć od 0° do 36°), przy różnych stanach sprotonowania kwasu glutaminowego. pK_a grup karboksylowych c -pierścienia w pozycji 0° obliczono na podstawie struktury (PDB 6B2Z) [8]. Rysunek wykorzystany na podstawie licencji CC-BY [54].

Dla przyjętego podstawowego stanu protonacji (reszta Glu zdeprotonowana w R i sprotonowana w B, niebieska krzywa na Rys. 20) obserwuje się lokalnie silną asymetrię profili energii swobodnej w okolicy 0° , co przekłada się na wyraźną kinetyczną preferencję rotacji w kierunku odpowiadającą syntezie ATP, wynoszącą około 15 kcal/mol. W tym wariantcie reszta Glu c -pierścienia znajdująca się w półkanale B pozostaje sprotonowana, a następnie wraz z ruchem rotacyjnym przesuwa się w stronę hydrofobowego wnętrza błony. Dzięki temu przesunięcie reszty Glu z półkanału B do hydrofobowej części błony następuje bez dużego kosztu energetycznego. Aby zbadać wpływ stanu sprotonowania reszty

Glu w półkanale B na energetykę rotacji, profil dla podstawowego wariantu porównano z alternatywnym scenariuszem, w którym Glu w obu półkanałach (B i R) znajdowały się w stanie zdeprotonowanym. Jak pokazano na Rys. 20, w zakresie pierwszych kilkunastu stopni obrotu ($0-10^\circ$) zmiana energii swobodnej w wariantcie zdeprotonowanym jest niższa o około 3 kcal/mol względem wariantu referencyjnego. Wynik ten sugeruje, że protonacja Glu w B może następować po obrocie o około 10° względem stanu referencyjnego. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi badaniami eksperymentalnymi na pojedynczych cząsteczkach białka (ang. *single-molecule studies*), które wskazywały istnienie podetapu rotacyjnego o wartości około 11° w mechanizmie rotacji kompleksu F_o *schlerichia coli* ???. Przy dalszym przesuwaniu się reszty w stronę hydrofobowego wnętrza błony korzystniejszy staje się jednak stan sprotonowany, co jest zgodne z intuicyjnym obrazem, w którym protonacja obniża koszt umieszczenia reszty w środowisku niepolarnym. Istotną rolę w mechanizmie rotacji wydaje się odgrywać także reszta Glu wchodząca do półkanału uwalniającego (pozycja pre-R na rysunku 20). Analiza profili energetycznych wskazuje, że moment deprotonacji tej reszty znacząco wpływa na energetykę rotacji. Gdy deprotonacja następuje już w pozycji pre-R, krzywa energii swobodnej w zakresie $0-20^\circ$ pozostaje na poziomie odniesienia (0 kcal/mol), co wskazuje na brak istotnej bariery rotacyjnej. Natomiast jeśli deprotonacja odbywa się dopiero po wejściu do półkanału R, obserwuje się wzrost energii w tym zakresie, co sugeruje pojawienie się dodatkowej bariery dla rotacji. Można więc wnioskować, że wcześniejsza deprotonacja w pre-R ułatwia rotację, zmniejszając barierę energetyczną i wzmacniając sprzężenie pomiędzy przepływem protonów a ruchem obrotowym *c*-pierścienia. Wyniki te stanowią istotne potwierdzenie dynamicznego powiązania między rotacją a procesami protonacji i deprotonacji w kompleksie F_o .

4.1.2 Mechanizm transferu protonów i indukcja jednokierunkowej rotacji *c*-pierścienia

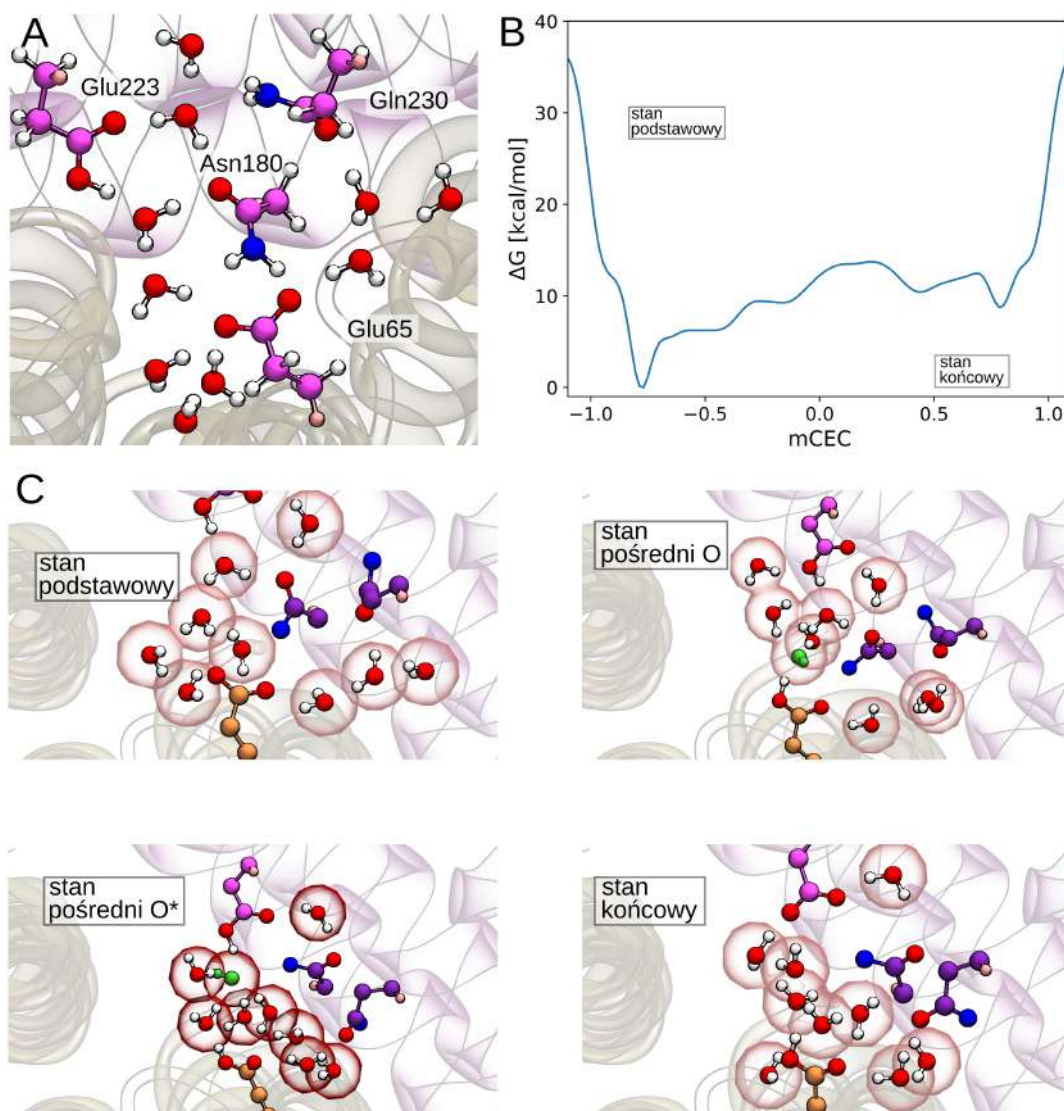
Biorąc pod uwagę ścisłe sprzężenie pomiędzy rotacją *c*-pierścienia a stanem protonacji reszt kwasu glutaminowego w półkanale wiążącym, postanowiłam szczegółowo zbadać mechanizm przeniesienia protonu, który inicjuje rotację w kierunku syntezy ATP. Zrozumienie tego etapu ma kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia, w jaki sposób gradient protonowy zostaje przekształcony w energię mechaniczną obrotu — a tym samym, jak zachodzi efektywne sprzężenie chemiosmotyczne w kompleksie F_o .

Do wyznaczenia profilu energii swobodnej dla procesu przeniesienia protonu wykorzystałam symulacje QM/MM z półempirycznym wariantem DFT (DFTB; patrz "Metoda ścisłego wiązania oparta o teorię funkcjonału gęstości" w rozdziale Metody) wspomagane metadynamiką. Początkowa struktura do symulacji QM/MM została wybrana z równowagowej symulacji kompleksu F_o (PDB: 6B2Z [10]), w której reszta kwasu glutaminowego *c*-pierścienia w półkanale uwalniającym oraz reszta kwasu glutaminowego w półkanale

wiązącym znajdowały się w stanie zdeprotonowanym. Wybrana klatka startowa odpowiadała konfiguracji przed rozpoczęciem transferu protonu do *c*-pierścienia w półkanale wiążącym. Wybrana klatka odpowiadała geometrii przed rozpoczęciem transferu protonu do *c*-pierścienia. Układ kwantowy obejmował 63 atomy: łańcuch boczny Glu *c*-pierścienia (akceptor protonu), Glu podjednostki *a* (donor protonu), sąsiednie reszty polarne (Asn180 i Gln230) oraz cząsteczki wody w odległości ≤ 5 Å od centrum układu (Rys. 21A).

Profil energii swobodnej wyznaczyłam wzdłuż współrzędnej ζ , która przyjmuje wartości od -1 (proton związany z Glu podjednostki *a*) do +1 (proton związany z Glu *c*-pierścienia). Krzywa zmiany energii swobodnej przedstawia pojedynczą barierę aktywacji o wysokości około 10 kcal/mol, oddzielającą dwa minima odpowiadające stabilnym stanom protonacji donora i akceptora (Rys. 21B). Wysokość bariery przekłada się na czas charakterystyczny transferu rzędu mikrosekund, co jest zgodne z typową kinetyką obrotu *c*-pierścienia. Oznacza to, że protonacja Glu65 przy omawianym kącie referencyjnym 0° jest z jednej strony kinetycznie dostępna, ale jednocześnie może stanowić etap limitujący szybkość całego procesu. Można zatem spekulować, że w kolejnych położeniach katowych (np. około 10°), kiedy reszty Glu zaangażowane w transfer protonu zbliżają się do siebie, protonacja przebiega szybciej. Jest to zgodne z wynikami profili rotacji omówionymi przeze mnie powyżej (Rys. 20), które pokazują, że rotacja formy zdeprotonowanej Glu65 w półkanale wiążącym do 10° jest łatwiejsza niż formy sprotonowanej. Uzyskane przeze mnie wyniki wspierają więc hipotezę, że transfer protonu staje się bardziej sprzyjający energetycznie przy większych wartościach kąta obrotu niż w strukturze referencyjnej.

Analiza trajektorii wykazała ponadto, że przy kącie 0° transfer protonu nie przebiega jako prosty skok między donorowym i akceptorowym tlenem, czego można by się spodziewać ze względu na dzielącą je odległość. Intuicyjnie natomiast można by się spodziewać mechanizmu typu Grotthussa, w którym transfer zachodzi dzięki tworzeniu się i zanikaniu jonów hydroniowych (H_3O^+). W tym mechanizmie proton „wędruje” przez sieć wiązań wodorowych, przekazywany od jednej cząsteczki wody do następnej. Przeprowadzone przeze mnie symulacje pokazują jednak odmienny scenariusz – mechanizm tzw. „dziury protonowej” (*proton hole mechanism*). Polega on na tym, że początkowo protonowany zostaje akceptor (Glu65 *c*-pierścienia), przy zachowaniu sprotonowanego donora (Glu223 podjednostki *a*), z jednoczesnym utworzeniem jonu hydroksylowego (OH^-) (czyli deficyt protonu) z cząsteczki wody znajdującej się w pobliżu Glu65 (Rys. 21C; stan pośredni O). Ta „dziura” protonowa przemieszcza się wzdłuż łańcucha cząsteczek wody: kolejna cząsteczka wody przekazuje proton na inną cząsteczkę wody, przekształcając się w OH^- . Proces ten powtarza się kaskadowo, do momentu, kiedy deprotonacji ulega początkowy donator (Glu223). Innymi słowy, zamiast ruchu nadmiarowego protonu jak w klasycznym mechanizmie Grotthussa, obserwowany jest ruch deficytu protonu, który „podąża” przez szlak wodny w kierunku donora.



Rysunek 21: Mechanizm przeniesienia protonów za pośrednictwem "dziury" protonowej w półkanale wiążącym F_o dla kąta 0° . (A) Reprezentacja CPK przedstawiająca podukład QM w półkanale wiążącym w symulacji DFTB. Jasnoróżowym kolorem zaznaczyłam miejsce odcięcia między systemem QM i MM. (B) Profil zmiany energii swobodnej transferu protonu w półkanale wiążącym dla referencyjnego kąta 0° uzyskany przy pomocy DFTB. (C) Stany procesu z zaznaczonym położeniem protonu. Reszty Glu pełniące rolę donora i akceptora protonu zaznaczono odpowiednio kolorem różowym (D) i pomarańczowym (A). Stan podstawowy reprezentuje stan, w którym proton związany jest z Glu podjednostki *a* (Glu223). Stan pośredni O odpowiada powstaniu cząsteczki OH^- (zaznaczona na zielono), która oddała proton na rzecz akceptora (Glu59). Stan pośredni O^* reprezentuje kolejny krok przeniesienia protonu na kolejną cząsteczkę wody (zaznaczona na zielono grupa OH^- gotowa do przyjęcia protonu z donora). Stan końcowy pokazuje proton związany z akceptorem Glu59 w półkanale wiążącym i zdeprotonowaną resztę Glu223.

4.1.3 Wpływ argininy na kierunkowość rotacji

Centralnie położona reszta argininy (Arg176) w podjednostce *a* kompleksu F_o (Rys. 3) jest ściśle zakonserwowana pośród wszystkich znanych wariantów syntazy ATP, co wskazuje na jej istotną rolę w mechanizmie rotacyjnym. Na podstawie danych literaturowych oraz wcześniejszych modeli funkcjonalnych [71, 183], zaproponowano, że aminokwas ten bierze udział w kierunkowej kontroli transportu protonów, oddzielając dwa półkanały — wiążący i uwalniający. W celu weryfikacji tej hipotezy postanowiłam zbadać wpływ reszty Arg176 na kierunkowość rotacji *c*-pierścienia oraz na energetykę całego procesu.

Aby to osiągnąć, we współpracy z Antonim Marciniakiem, przygotowaliśmy wariant mutacyjny, w którym Arg176 zastąpiono alaniną (mutacja Arg176Ala). Następnie przeprowadziłam serię symulacji rotacji *c*-pierścienia dla tego wariantu oraz dla formy dzikiej (ang. *wild type*, WT), w celu porównania profili energii swobodnej w obu kierunkach rotacji.

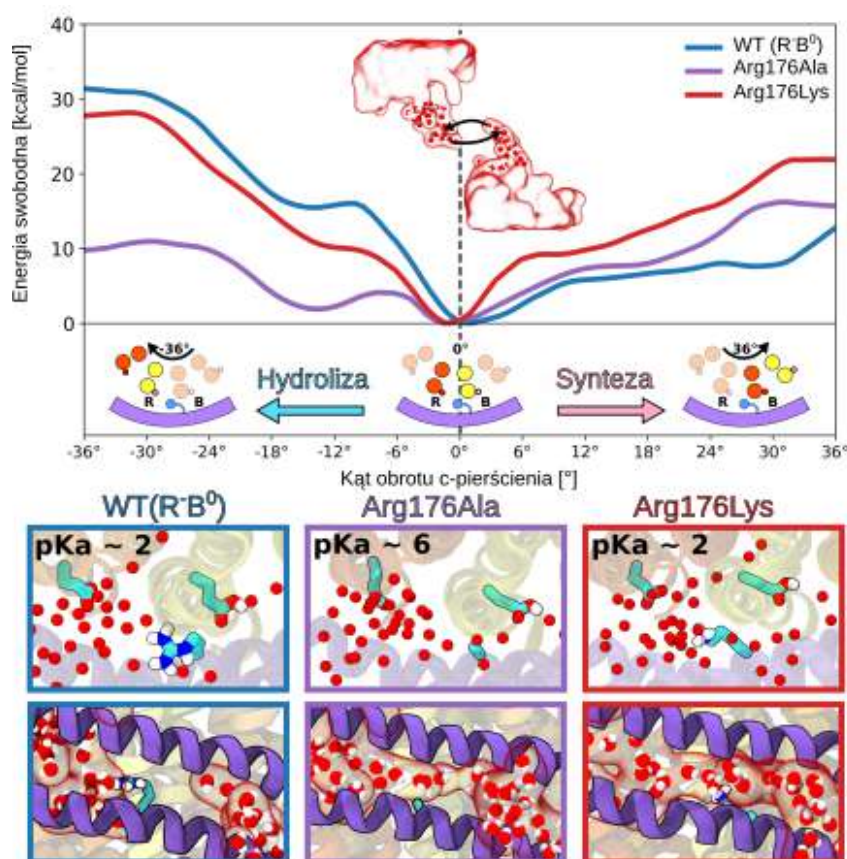
Wyniki, przedstawione na Rys. 22, wykazały, że mutacja Arg176Ala (fioletowa krzywa) znosi naturalną kierunkowość rotacji. W wariantcie dzikim (WT; niebieska krzywa) zaobserwowałam silną preferencję rotacji w kierunku syntezy ATP (poprzez obniżenie bariery energetycznej w kierunku syntezy). W wariantcie mutanta Arg176Ala różnica ta zanikła, co skutkowało obniżeniem bariery dla rotacji w kierunku hydrolizy — o około 15 kcal/mol w porównaniu do WT. Obie ścieżki rotacji (w kierunku syntezy i hydrolizy) stały się w tym przypadku energetycznie porównywalne, co oznacza utratę naturalnej preferencji do rotacji w kierunku syntezy ATP.

Dla porównania, analiza drugiej wysoce zakonserwowanej reszty argininy, Arg169 (Rys. 3), wykazała odmienny efekt. Jej usunięcie (mutacja Arg169Ala) nie wpłynęło na kierunkowość obrotu, a jedynie obniżyło wysokość barier energetycznych w obu kierunkach względem WT. O ile Arg176 okazuje się kluczowa dla utrzymania jednokierunkowej rotacji, o tyle Arg169 pełni głównie rolę w regulacji efektywności procesu.

Dalsze badania miały na celu sprawdzenie, czy funkcję Arg176 można zachować poprzez zamianę na inny dodatnio naładowany aminokwas. W tym celu przeprowadziłam symulacje dla mutacji Arg176Lys. Wyniki zaprezentowane na Rys. 22 (krzywa czerwona) wykazały, że choć lizyna również posiada dodatni ładunek, nie jest w stanie zastąpić funkcjonalnie argininy w tym miejscu. Dla kąta obrotu od 0° do 6° bariera energetyczna dla rotacji w kierunku syntezy wzrosła o około 7,5 kcal/mol w porównaniu do WT, co odpowiada obniżeniu szybkości rotacji o 5 rzędów wielkości. Jednocześnie bariera dla rotacji w kierunku hydrolizy pozostała wysoka (ok. 12 kcal/mol), co w praktyce blokuje rotację w obu kierunkach.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że obecność argininy w pozycji 176 jest kluczowa dla zachowania kierunkowości rotacji *c*-pierścienia. W obu wariantach mutacyjnych (Arg176Ala i Arg176Lys) zaobserwowałam zaburzenie struktury dwóch oddzielnych pół-

kanałów i powstanie ciągłego, wodnego kanału protonowego. Taka ciągłość prowadzi do rozprzęgnięcia transportu protonów i rotacji *c*-pierścienia, umożliwiając bierny przeciek protonów między półkanałami. Oznacza to, że Arg176 pełni funkcję bariery elektrostatycznej i strukturalnej, która zapobiega bezpośredniemu przeciekowi protonów między półkanałami. Jej obecność umożliwia precyzyjne rozdzielanie etapu protonacji i deprotonacji reszty Glu65 w *c*-pierścieniu, zapewniając tym samym kierunkowość i wydajność rotacji. Odkrycia te rzucają nowe światło na fundamentalny mechanizm działania kompleksu F_o i jego rolę w konwersji energii chemicznej na mechaniczną w procesie syntezy ATP.



Rysunek 22: (A) Porównanie profili energii swobodnej dla rotacji F_o między wariantem typu dzikiego i mutacjami centralnej argininy Arg176 (Arg176Ala, Arg176Lys). (B) Obliczone wartości pK_a grupy karboksylowej w półkanale uwalniającym i reprezentatywny rozkład cząsteczek wody. Rysunek wykorzystany na podstawie licencji CC-BY z [54].

4.2 Wpływ inhibitora na rotację kompleksu F_o na przykładzie bedakiliny

4.2.1 Mechanizm tworzenia kompleksu białko-inhibitor

Energia wiązania Bq na powierzchni c -pierścienia

Dzięki rentgenografii strukturalnej uzyskano w 2015 roku pierwszą strukturę syntazy ATP związanej z bedakiliną (PDB 4V1F) [21]. Struktura ta ujawniła lokalizację inhibitora na powierzchni c -pierścienia kompleksu F_o pochodzącego z *Mycobacterium phlei*. Pomimo tego istotnego odkrycia, mechanizm molekularny wiązania bedakiliny oraz sposób, w jaki dochodzi do inhibicji rotacji c -pierścienia, pozostają nadal nie w pełni poznane. Dotychczasowe dane strukturalne nie pozwalały jednoznacznie wyjaśnić, w jaki sposób stan sprotonowania reszt aminokwasowych oraz samego inhibitora wpływa na jego powinowactwo i skuteczność blokowania funkcji enzymu.

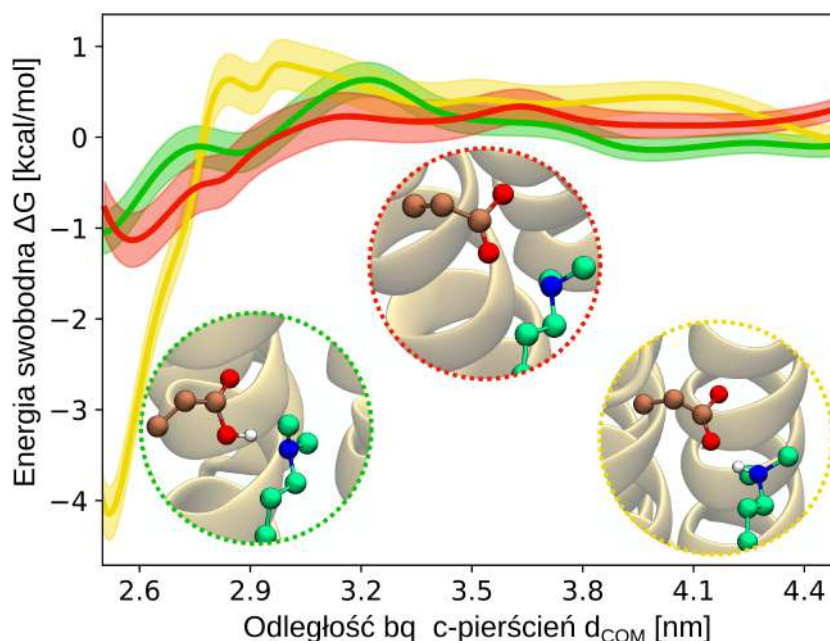
Celem przeprowadzonych przeze mnie badań było określenie preferowanego energetycznie mechanizmu wiązania bedakiliny do powierzchni c -pierścienia w zależności od stanów sprotonowania. Motywacją do podjęcia tego zagadnienia była potrzeba lepszego zrozumienia zależności pomiędzy mikroskopową strukturą kompleksu F_o a jego funkcjonalną inhibicją przez leki, co może mieć kluczowe znaczenie dla projektowania skuteczniejszych inhibitorów syntazy ATP, stosowanych obecnie w leczeniu gruźlicy.

W tym celu wyznaczyłam profile energii swobodnej (inaczej potencjał średniej siły; ang. *Potential of Mean Force*, PMF) dla wiązania bedakiliny do białka w trzech różnych wariantach protonacyjnych. Jako wariant podstawowy (zielony na rysunku 23) przyjąłam konfigurację, w której reszta glutaminowa Glu65 w c -pierścieniu pozostaje w stanie sprotonowanym, a cząsteczka bedakiliny (Bq) w stanie zdeprotonowanym. W takim wariancie oba elementy układu są elektrycznie obojętne, co odpowiada oczekiwany warunkom hydrofobowego wnętrza błony lipidowej, które charakteryzuje się niską siłą dielektryczną. Dla porównania przygotowałam także wariant odwrotny (żółty), w którym Glu65 była zdeprotonowana, a Bq sprotonowana, oraz wariant pozbawiony protonu (czerwony), w którym Glu65 była zdeprotonowana, a Bq neutralna.

Do uzyskania profili energii swobodnej wiązania zastosowałam metodę próbkowania parasolowego (ang. *umbrella sampling*; US), wykorzystując stały zewnętrzny potencjał harmoniczny, który utrzymywał cząsteczkę inhibitora w zadanych odległościach od powierzchni c -pierścienia. Pozwoliło mi to porównać stabilność kompleksu w różnych wariantach protonacji pomiędzy Glu65 c -pierścienia i Bq oraz ocenić, który z nich sprzyja silniejszemu wiązaniu inhibitora.

Wyniki tych obliczeń przedstawiłam na Rys. 23. W stanie podstawowym (zielona krzywa), w którym reszta Glu65 c -pierścienia jest sprotonowana, a bedakilina (Bq) zde-

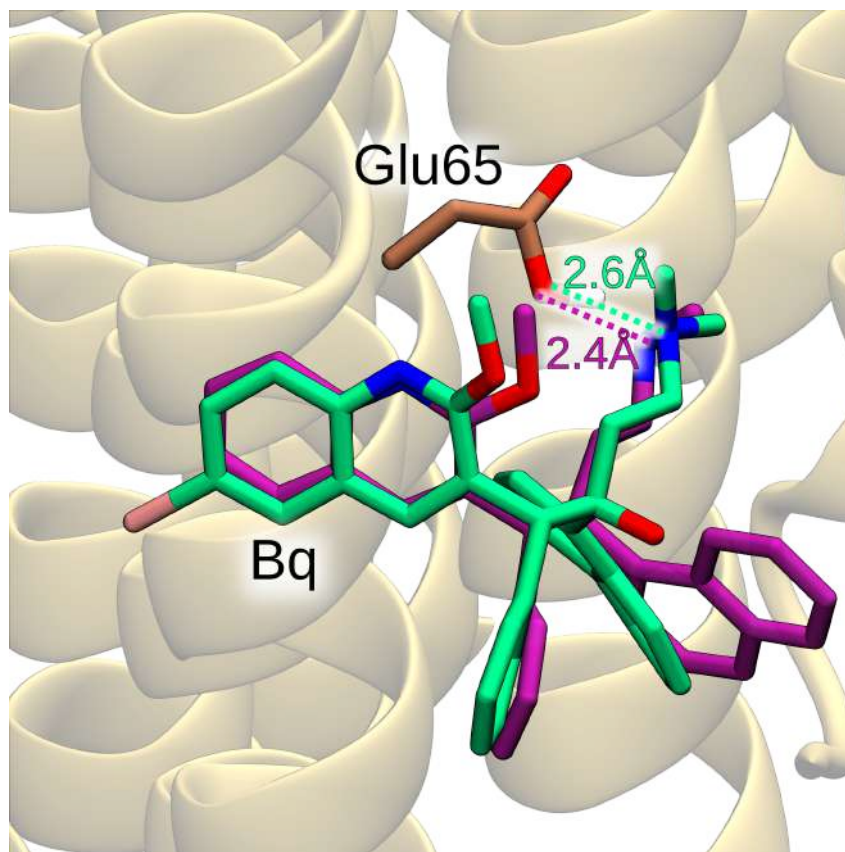
protonowana (obie cząsteczki elektrycznie obojętne), zmiana swobodnej energii wiązania wynosi około -1 kcal/mol . Wartość ta jest znacząco mniejsza niż odpowiadająca jej wartość doświadczalna oszacowana na podstawie pomiarów metodą powierzchniowego rezonansu plazmonowego (ang. *Surface Plasmon Resonance*, SPR), która wynosi około -8 kcal/mol [90]. Rozbieżność ta najprawdopodobniej wynika z ograniczeń pola siłowego w opisie takich parametrów jak polaryzacja czy delokalizacja ładunku, a także z uproszczeń modelu obliczeniowego, takich jak ograniczony czas symulacji i wynikająca z tego niepełna eksploracja możliwych konformacji cząsteczki inhibitora.



Rysunek 23: Porównanie wpływu stanu protonacji na energię swobodną wiązania Bq z mykobakteryjnym *c*-pierścieniem w oparciu o profile energetyczne otrzymane przy pomocy techniki US.

Należy zauważyć, że pomimo silnie zaniżonego powinowactwa, porównanie struktury kompleksu uzyskanego w symulacjach z eksperymentalną strukturą krystaliczną wskazuje na ich wysoką zgodność przestrzenną. Średnie odchylenie kwadratowe (ang. *Root-Mean-Square Deviation*, RMSD) pomiędzy strukturami wynosi $0,22 \text{ nm}$, co sugeruje, że pozycja bedakiliny względem powierzchni *c*-pierścienia została prawidłowo odwzorowana w modelu obliczeniowym. Porównanie struktur eksperymentalnej i symulowanej zostało przedstawione na Rys. 24.

Na uwagę zasługują również alternatywne warianty protonacji. Usunięcie protonu grupy karboksylowej Glu65 (czerwona krzywa na Rys. 23), które uniemożliwia wytworzenie wiązania wodorowego z białkiem, nie wpływa istotnie na energię swobodną wiązania leku, co potwierdza niemal identyczne powinowactwo względem wariantu neutralnego (ok. -1 kcal/mol). Wynik ten sugeruje, że zastosowane pole siłowe nie jest w stanie właściwie oddać wpływu wiązania wodorowego pomiędzy grupą karboksylową Glu65 a Bq na



Rysunek 24: Porównanie optymalnej pozycji wiązania Bq wyznaczonej na podstawie symulacji energii swobodnej oparte na polu siłowym (zielony) w stosunku do struktury kryystalograficznej kompleksu *c*-pierścieni/Bq (PDB: 4V1F) (fioletowy). Nieefektywność pola siłowego dla odpowiedniego opisu silnej natury wiązania wodorowego doprowadziła do wydłużenia długości HB między Bq i Glu65 do zakresu powszechnie obserwowanego w słabych wiązaniach wodorowych (odległość akceptor-donor ok. 2,6Å). Rysunek wykorzystany z pracy [155] na podstawie udzielonej zgody.

powinowactwo Bq do jego targetu. Wynika to najpewniej z uproszczonego opisu wiązania wodorowego – oddziaływania, którego siła istotnie zależy od struktury elektronowej cząsteczek.

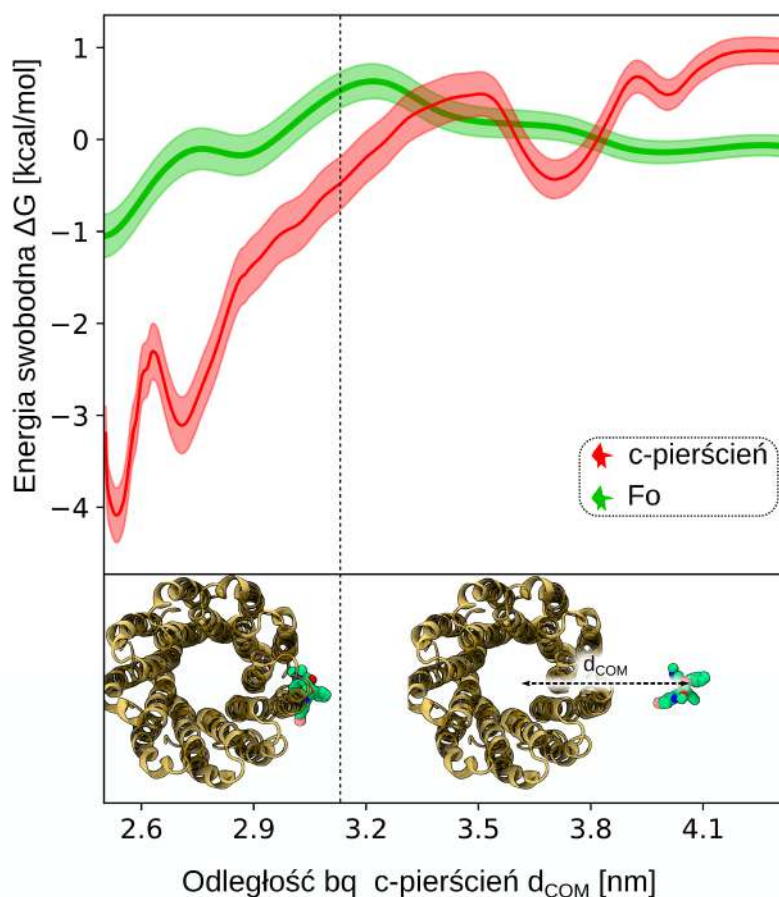
Wyraźna różnica w energii swobodnej wiązania Bq pojawia się dopiero w przypadku układu z możliwością wytworzenia pary jonowej (żółta krzywa na Rys. 23). Odpowiada to sytuacji, gdy Glu65 występuje w formie zdeprotonowanej (ujemnie naładowanej), a Bq jest sprotonowana (dodatnio naładowana). W tej konfiguracji energia wiązania wynosi około -4 kcal/mol, co wskazuje na dominujący wpływ oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy przeciwnie naładowanymi grupami w tym wariantie protonacyjnym. Wynik ten jednoznacznie wskazuje, że zastosowane pole siłowe nie odwzorowuje w pełni poprawnie wartości bezwzględnych energii swobodnych wiązania bedakiliny z białkiem F_o , a uzyskane profile mogą niedoszacowywać znaczenia oddziaływań specyficznych, takich jak wiązania wodorowe czy indukowane efekty polaryzacyjne.

Energia wiązania Bq na interfejsie *c*-pierścienia i podjednostki *a*

Kolejnym krokiem w analizie powinowactwa Bq do kompleksu F_o było rozszerzenie modelu na pełną strukturę białka w jego naturalnym środowisku błonowym. Celem tego etapu było uwzględnienie dodatkowych oddziaływań pomiędzy inhibitorem a aminokwasami podjednostki *a*, które mogły być pominięte w uproszczonym modelu ograniczonym jedynie do *c*-pierścienia. W tym celu wykorzystałam pochodzącą z mikroskopii krioelektronowej strukturę kompleksu F_o ze związaną cząsteczką Bq (PDB: 7JGC) [83], w której inhibitor zlokalizowany jest na interfejsie pomiędzy *c*-pierścieniem a podjednostką *a*. Na jej podstawie przygotowałam model obejmujący cały interfejs wraz z resztami bezpośrednio kontaktującymi się z inhibitorem. Strukturę tego kompleksu zaprezentowałam na Rys. 26.

Do wyznaczenia profilu energii swobodnej wiązania (Rys. 25) zastosowałam metodę próbkowania parasolowego, w której jako współrzędną reakcji wykorzystałam odległość cząsteczki inhibitora od środka masy atomów białka (d_{COM}). To pozwoliło mi na ilościową ocenę energetyki procesu wiązania Bq na interfejsie *c*-pierścień/podjednostka *a*. Analizę przeprowadziłam dla neutralnego wariantu protonacyjnego (sprotonowana reszta Glu65, zdeprotonowana Bq), przyjętego jako najbardziej prawdopodobny w hydrofobowym środowisku błony. Uzyskana energia swobodna wiązania w tym modelu wyniosła około -5 kcal/mol , co stanowi wartość pośrednią pomiędzy wcześniejszym wynikiem dla modelu opartego wyłącznie na *c*-pierścieniu (-1 kcal/mol) a wartością eksperymentalną wyznaczoną metodą SPR (-8 kcal/mol) [90]. Wynik ten wskazuje, że obecność podjednostki *a* wyraźnie zwiększa powinowactwo inhibitora, a preferowane energetycznie miejsce wiązania leży na interfejsie, a nie wyłącznie na podjednostkach *c*. Biorąc pod uwagę, że omawiane wyżej wartości eksperymentalne energii wiązania uzyskane techniką SPR wykonywano na układach obejmujących jedynie *c*-pierścienie, można by więc oczekiwać, że w rzeczywistym kompleksie energia wiązania jest wyższa niż 8 kcal/mol (wartość uzyskana doświadczalnie dla izolowanego *c*-pierścienia), a preferencja wiązania w rejonie interfejsowym odgrywa kluczową rolę w stabilizacji kompleksu lek-cel molekularny.

Warto jednak podkreślić, że zastosowane przeze mnie pole siłowe nie odwzorowuje poprawnie wszystkich specyficznych oddziaływań, w szczególności tzw. silnych wiązań wodorowych (SSHB), których obecność w kompleksie Bq- F_o sugerują zarówno struktury krystalograficzne, jak i cryo-EM. Niedoszacowanie wkładu tych oddziaływań jest prawdopodobnie główną przyczyną zaniżonego powinowactwa w modelach klasycznych. Dlatego, aby uzyskać bardziej wiarygodny opis stabilizacji Bq na powierzchni kompleksu F_o , konieczne było sięgnięcie po metody kwantowe, które zostaną omówione w dalszej części pracy.



Rysunek 25: Profil energii swobodnej wiązania Bq na powierzchni mykobakteryjnego *c*-pierścienia określony za pomocą symulacji US opartych na polu siłowym. Aby oszacować wpływ wiązania Bq na interfejsie *c*-pierścień/podjednostka *a* porównałam profile wiązania Bq na powierzchni *c*-pierścienia (czerwony) i w ramach pełnego kompleksu *F_o* (zielony).

Dekompozycja energii wiązania bedakiliny z kompleksem *F_o*

Niezależnie od nieadekwatnego opisu energetyki wiązania wodorowego między Bq a Glu65, wykorzystanie pola siłowego pozwoliło na oszacowanie wkładów energetycznych poszczególnych reszt aminokwasowych w stabilizację kompleksu białko–inhibitor. Taka analiza umożliwiła mi identyfikację kluczowych elementów powierzchni *c*-pierścienia odpowiedzialnych za tworzenie i utrzymanie kompleksu z inhibitorem oraz określenie charakteru ich oddziaływań z Bq, co może stanowić podstawę do projektowania bardziej selektywnych i skutecznych pochodnych tej cząsteczki.

W tym celu, na podstawie danych pochodzących z próbkowania parasolkowego, przeprowadziłam dekompozycję energii wiązania inhibitora względem wybranych reszt aminokwasowych. Analiza została wykonana zarówno dla uproszczonego modelu obejmującego jedynie *c*-pierścień (struktura PDB: 4V1F; Rys. 26), jak i dla pełnego interfejsu *c*-pierścień–podjednostka *a* (struktura PDB: 7JGC).

W obu przypadkach zaobserwowałam, że główny wkład (rzędu blisko 10 kcal/mol) w stabilizację cząsteczki leku na powierzchni białka pochodzi od trzech reszt zlokalizowanych w *c*-pierścieniu. Kluczową rolę odgrywa reszta glutaminianu Glu65, znana z funkcji w transporcie protonów. Jej obecność i położenie umożliwiają powstawanie korzystnych oddziaływań elektrostatycznych i wiązania wodorowego ze sprotonowaną grupą aminową Bq.

Dodatkowo, istotny wkład do energii tworzeniu kompleksu zaobserwowałam dla dwóch sąsiadujących reszt aromatycznych: fenyloalaniny w pozycji 69 (Phe69) (wkład około 7 kcal/mol) oraz tyrozyny w pozycji 68 (Tyr68) (wkład w energię wiązania około 5 kcal/mol) (Rys. 26). Reszty te oddziałują z pierścieniami aromatycznymi inhibitora za pośrednictwem oddziaływań $\pi - \pi$ oraz van der Waalsa, co znacząco wzmacnia wiązanie Bq w kieszeni *c*-pierścienia.

W analizie pojawił się również istotny wkład stabilizujący od oddziaływań dyspersyjnych z udziałem reszty izoleucyny w pozycji 70 (Ile70), należącej do sąsiedniej podjednostki *c*-pierścienia. Jej lokalizacja względem inhibitora sprzyja powstawaniu hydrofobowej powierzchni kontaktu, która stabilizuje cząsteczkę Bq w miejscu wiązania.

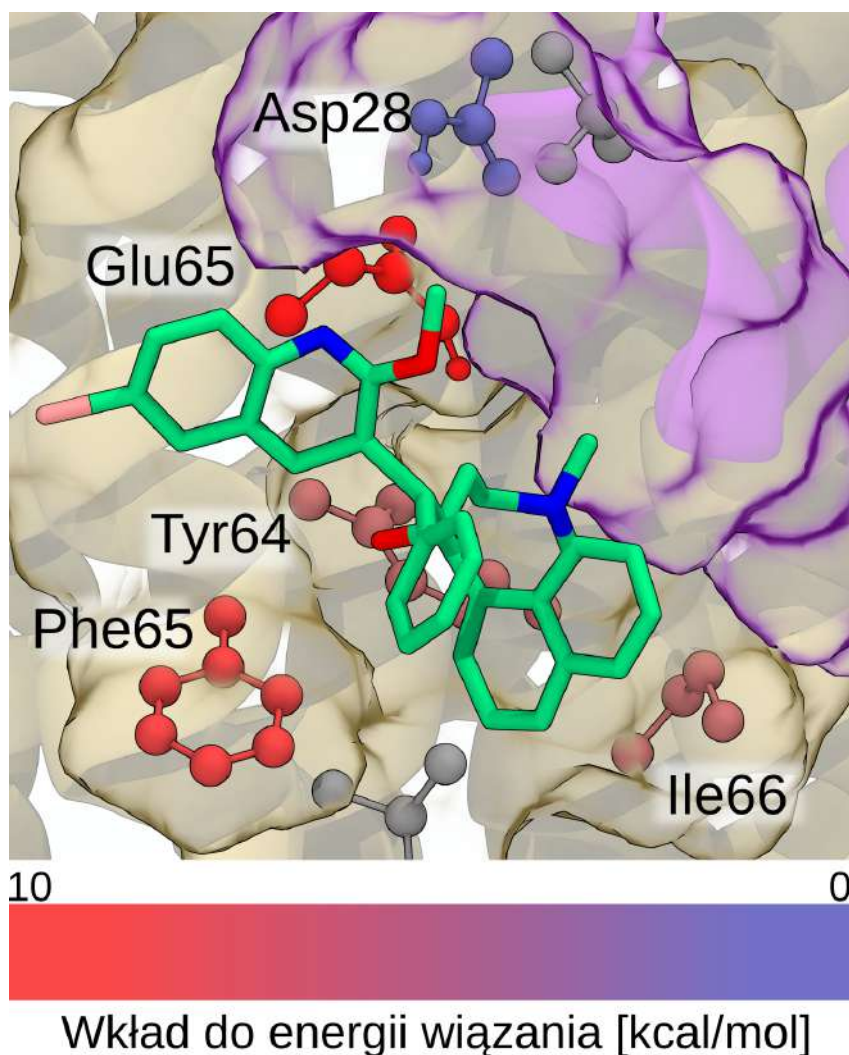
Podsumowując, przeprowadzona przeze mnie dekompozycja wskazuje, że wiązanie Bq w *c*-pierścieniu stabilizowane jest przede wszystkim przez oddziaływania polarne (głównie wiązanie wodorowe) z Glu65, oddziaływania aromatyczne z Tyr68 i Phe69, oraz kontakty dyspersyjne z alifatycznym fragmentem Ile70. Wynika z tego, że kluczowe dla siły i selektywności wiązania Bq są jej grupy aromatyczne i polarne, które współpracują z odpowiednio ukształtowaną kieszenią białka.

Jak wcześniej wykazałam, obecność podjednostki *a* znacząco zwiększa powinowactwo Bq do kompleksu F_o , stabilizując jej wiązanie na powierzchni kontaktu *c*-pierścień/*a*. W tym kontekście zidentyfikowałam dodatkowe reszty aminokwasowe podjednostki *a*: izoleucynę w pozycji 239 (Ile239), prolinę w pozycji 240 (Pro240) oraz fenyloalaninę w pozycji 243 (Phe243). Reszty te pozostają w bliskim kontakcie z pierścieniami aromatycznymi Bq (naftalenowym i benzenowym), wzmacniając stabilizację kompleksu poprzez oddziaływania dyspersyjne.

4.2.2 Analiza silnego wiązania wodorowego w aspekcie inhibicji kompleksu F_o przez Bq

Tworzenie silnego wiązania wodorowego

Motywacją do przeprowadzenia pogłębionej analizy oddziaływań pomiędzy inhibitorem Bq a syntazą ATP była obserwacja, że uproszczony opis oferowany przez pole siłowe nie oddaje w pełni natury wiązania tego związku na powierzchni białka. Wyniki uzyskane w ramach analizy wiązania przy użyciu symulacji typu US wskazały, że choć dopasowanie



Rysunek 26: Położenie Bq na powierzchni π -pierścienia z zaznaczonymi resztami oddziałującymi z Bq. Skala poniżej reprezentuje wkład danego aminokwasu do energii wiązania Bq-białko. Wraz ze spadkiem wkładu do energii wiązania kolor aminokwasów zmienia się z czerwonego na niebieski.

przestrzenne i oddziaływania van der Waalsa odgrywają istotną rolę w stabilizacji kompleksu białko-inhibitor, nie są one wystarczające do wyjaśnienia mechanizmu silnego i selektywnego wiązania Bq.

Analiza energetyczna wskazała, że kluczowym elementem stabilizacji kompleksu pominiętym w opisie klasycznym jest wiązanie wodorowe pomiędzy grupą karboksylową reszty Glu65 a grupą dimetyloaminową Bq. Charakterystyka strukturalna tego oddziaływania wskazuje, że nie jest to klasyczne wiązanie wodorowe, lecz należy do typu krótkich silnych wiązań wodorowych (ang. *Short Strong Hydrogen Bonds*, SSHB). W celu dokładnego opisu natury tego wiązania zastosowałam symulacje dynamiki molekularnej w wariantcie QM/MM łączącym mechanikę kwantową z uproszczonym opisem pola siłowego, opartym na teorii funkcjonalnej gęstości, zaimplementowane w interfejsie NAMD/ORCA27.

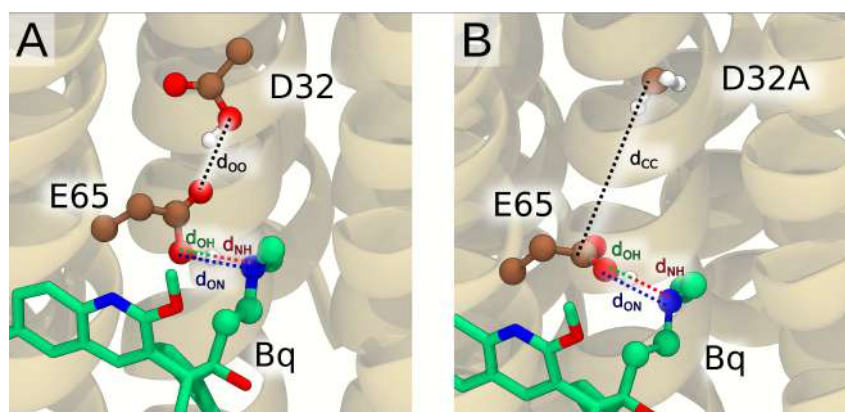
W regionie kwantowym uwzględniłam boczne łańcuchy reszt Glu65 i Asp32 oraz grupę dimetyloaminową inhibitora Bq. Schemat badanego układu z zaznaczonymi odległościami omawianymi poniżej przedstawiłam na Rys. 27A.

W celu określenia energii i geometrii analizowanego wiązania określiłam efektywny potencjał wiązania wodorowego poprzez wyznaczenie profili zmiany energii swobodnej metodą próbkowania parasolkowego (US), wzdłuż współrzędnej d_{OH} (Rys. 27A), która opisuje transfer protonu między O Glu65 i N Bq. Przy niższych wartościach d_{OH} proton związany jest z O, natomiast przy wyższych – przy N.

Uzyskana krzywa energii swobodnej zaprezentowana na Rys. 28A wskazuje na obecność dwóch minimów wzdłuż współrzędnej reakcji: jedno odpowiadające konfiguracji z protonem związanym z grupą karboksylową Glu65 (forma neutralna), drugie z protonem przy grupie aminowej Bq (forma „mostka solnego”). Różnica energii pomiędzy tymi stanami wyniosła około 0,8 kcal/mol, przy czym (nieco) stabilniejsza była konfiguracja z protonem na Glu65. Warto zaznaczyć, że bariera transferu protonu między heteroatomami była bardzo niska (ok. 1 kcal/mol) - w szczególności niższa od typowych energii drgań zerowych w modach rozciągających między O–H lub N–H, dla których standardowo wynosi ona 5–6 kcal/mol. Otrzymany wynik wskazuje zatem na możliwość dynamicznego współdzielenia protonu między oboma cząsteczkami, co jest cechą charakterystyczną SSHB.

Szczegółowa charakterystyka strukturalna i energetyczna potwierdziła ten wniosek. Średnia odległość O–N (d_{ON}) w analizowanym układzie, w którym występowały dwa stany - wariant z protonowaną Glu i zdeprotonowaną Bq, jak i wariant odwrotny – wynosiła 2,54 Å (Rys. 28B). Obliczenia przeprowadzone metodą DFT z korekcją superpozycji bazy (w kilku wariantach funkcjonałów i baz funkcyjnych) wskazały, że energia wiązania w stanie neutralnym mieści się w zakresie od –19 do –21 kcal/mol niezależnie od zastosowanego funkcjonału i bazy. Wyniki zaprezentowałam na Rys. 30 oraz w tabeli 1. Niezależnie przeprowadzona analiza topologii gęstości elektronowej (QTAIM) pozwoliła na wyznaczenie wartości gęstości w punkcie krytycznym wiązania wodorowego (ang. *Bond Critical Point*, BCP). Zarówno w przypadku formy neutralnej, jak i podwójnego jonu (zwitterion), punkt krytyczny wiązania wodorowego charakteryzował się gęstością równą w przybliżeniu 0,10 e/Å³ (Rys. 29). Dla formy zdelokalizowanego protonu między donorem i akceptorem (equidistant) sygnał ten był jeszcze silniejszy i wynosił 0,164 e/Å³. Wszystkie te wartości mieszczą się w zakresie typowym dla quasi-kowalencyjnych wiązań wodorowych (0,08–0,14 e/Å³) [184]. Dodatkowo w każdym z wariantów obecne były także słabsze punkty krytyczne, odpowiadające oddziaływaniom pomocniczym (zarówno o charakterze klasycznych, jak i słabych wiązań wodorowych oraz kontaktów pierścień–atom), których gęstości mieściły się w przedziale 0,002–0,05 e/Å³. Choć wartości te są znacznie niższe, wskazują na istnienie sieci dodatkowych oddziaływań stabilizujących kompleks. Wyniki powyższe stanowią dodatkowe potwierdzenie, że obserwowane oddziaływanie należy do

grupy krótkich, silnych wiązań wodorowych o częściowo kowalencyjnym charakterze.



Rysunek 27: (A) Definicja odległości międzyatomowych w układzie kwantowym Bq związanej na powierzchni *c*-pierścienia w wariancie WT. (B) Definicja odległości międzyatomowych w układzie kwantowym Bq związanej na powierzchni *c*-pierścienia w wariancie mutacji Asp32Ala. Rysunek wykorzystany z pracy [155] na podstawie udzielonej zgody.

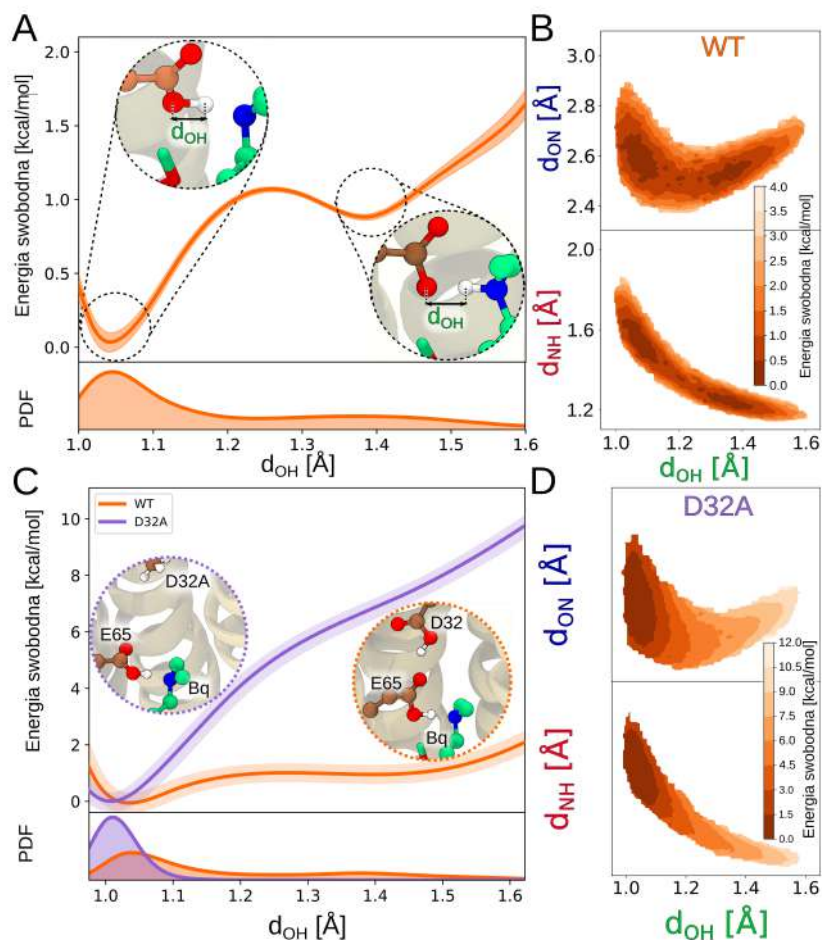
Specyficzność i selektywność wiązania wodorowego

Wiedząc, że kluczową rolę w tworzeniu kompleksu F_o z Bq odgrywa wiązanie wodorowe typu SSHB, podjęłam próbę zidentyfikowania warunków koniecznych do jego utworzenia. Szczególną uwagę zwróciłam na resztę aminokwasową Asp32, specyficzną dla *c*-pierścienia syntazy ATP u mykobakterii.

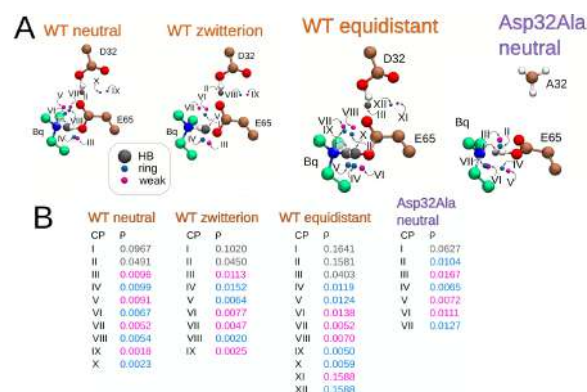
W przeprowadzonych przeze mnie symulacjach QM/MM, w których łańcuch boczny Asp32 został uwzględniony w kwantowym regionie obliczeniowym (Rys. 27A), zaobserwowałam, że oprócz skróconego wiązania wodorowego (SSHB) między grupą karboksylową Glu65 a dimetyloaminową grupą Bq, tworzy się również dodatkowe, klasyczne wiązanie wodorowe pomiędzy Glu65 a Asp32. Obecność tego oddziaływania potwierdziła analiza topologii gęstości elektronowej (QTAIM) przeprowadzona przez członka naszego zespołu badawczego, Subrahmanyama Sappatiego, która wykazała punkt krytyczny odpowiadający tej interakcji (Rys. 29). We wszystkich wariantach WT gęstość wynosiła około $0,04 \text{ e}/\text{\AA}^3$. Biorąc pod uwagę, że choć odległość donor–akceptor w tym przypadku wynosi $d_{ON} = 2.65 \text{\AA}$, a samo wiązanie zalicza się do stosunkowo słabych, jego obecność może stabilizować SSHB. Zgodnie z literaturą, dodatkowe elementy sieci wiązań wodorowych mogą wzmacniać silniejsze oddziaływania i wpływać na ich właściwości strukturalne oraz energetyczne [185]. W przypadku kompleksu F_o –Bq występuje więc taka sieć.

Aby zweryfikować hipotezę o istotnej roli Asp32 w stabilizacji wiązania typu SSHB, przeprowadziłam mutację tej reszty na alaninę (Asp32Ala), eliminując możliwość tworzenia przez nią wiązań wodorowych.

Następnie, wykorzystując metodę próbkowania parasolkowego w ramach hybrydowych



Rysunek 28: (A) Profil energii swobodnej dla transferu protonu w wariantcie WT między heteroatomami zaangażowanymi w wiązanie wodorowe Bq-Glu65, obliczony przy użyciu symulacji QM/MM z zastosowaniem techniki US. Dolny panel pokazuje odpowiadający rozkład gęstości prawdopodobieństwa wzdłuż współrzędnej reakcji d_{OH} . (B) Krajobrazy energii swobodnej opisujące korelację między odległościami d_{OH} , d_{ON} i d_{NH} w wariantcie WT. Oznaczenia odległości wyjaśnione są na Rys. 27A. (C) Porównanie profili energii swobodnej dla transferu protonu w wariantcie WT (pomarańczowy) oraz mutacji (Asp32Ala; fioletowy) między heteroatomami zaangażowanymi w wiązanie wodorowe Bq-Glu65. Dolny panel przedstawia odpowiadające im rozkłady gęstości prawdopodobieństwa wzdłuż współrzędnej reakcji d_{OH} . (D) Krajobrazy energii swobodnej opisujące korelację między odległościami d_{OH} , d_{ON} i d_{NH} w wariantcie mutacji Asp32Ala. Rysunek wykorzystany z pracy [155] na podstawie udzielonej zgody.



Rysunek 29: (A) Położenia punktów krytycznych odpowiadających różnym typom oddziaływań pomiędzy grupą aminową Bq i *c*-pierścieniem (legenda: HB - punkt krytyczny wiązania wodorowego, ring - punkt krytyczny pierścienia, weak - punkt krytyczny słabego oddziaływania). Rozważono cztery różne przypadki: WT *c*-pierścień z protonem zlokalizowanym na Glu65 (WT neutralny), WT *c*-pierścień z protonem zlokalizowanym na Bq (WT zwitterion), WT *c*-pierścień z protonem w równej odległości od obu heteroatomów (WT equidistant) oraz wariant Asp32Ala *c*-pierścienia z protonem zlokalizowanym na Glu65 (Asp32Ala neutralny). Rozmiary sfer są proporcjonalne do odpowiednich wartości gęstości elektronowej, które są pokazane na panelu (B) w e/A^3 . Pozycje punktów krytycznych, jak i ich gęstości elektronowe zostały uśrednione po zestawie 100 losowych okien symulacyjnych MD wyodrębnionych z równowagowych trajektorii QM/MM. Rysunek wykorzystany z pracy [155] na podstawie udzielonej zgody.

symulacji QM/MM, podobnie jak w przypadku F_o w wariancie WT, wyznaczyłam profil energii swobodnej wzdłuż współrzędnej reakcji zdefiniowanej jako odległość między donorem i wodorem (d_{OH}), opisującej transfer protonu pomiędzy grupą karboksylową Glu65 a dimetyloaminową grupą Bq (Rys. 27B). Wybór tej współrzędnej, podobnie jak w przypadku WT, wynikał z jej bezpośredniego związku z mechanizmem tworzenia SSHB oraz możliwością jednoznacznego rozróżnienia stanów związanych z lokalizacją protonu. Uzyskany na tej podstawie profil energii swobodnej dla wariantu mutacji Asp32Ala zaprezentowałam na Rys. 28C.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały, że mutacja Asp32Ala prowadzi do istotnych zmian w charakterystyce wiązania wodorowego. Profil energetyczny przyjął postać typową dla klasycznego wiązania wodorowego, z wyraźnym pojedynczym minimum odpowiadającym lokalizacji protonu po stronie donora – grupy karboksylowej Glu65.

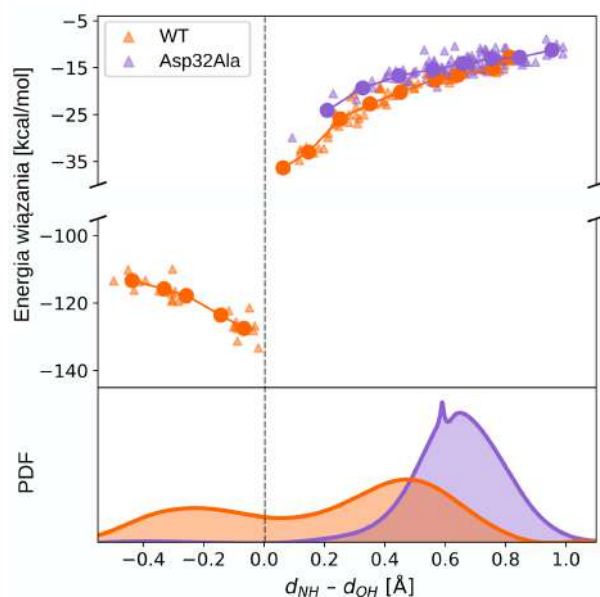
W konsekwencji zaobserwowałam również spadek średniej energii wiązania o około 6 kcal/mol w porównaniu do typu dzikiego (WT) (Rys. 30). Dodatkowo, gęstość elektronowa w punkcie krytycznym wiązania obniżyła się do 0.06 e/Å³, co odpowiada wartościom charakterystycznym dla standardowych, słabszych wiązań wodorowych (Rys. 29).

Mutacja wpłynęła również na geometrię oddziaływania: średnia odległość pomiędzy atomami O i N (d_{ON}) wzrosła z 2,54 Å (dla WT) do 2,67 Å (Rys. 28). Zaobserwowałam także zmniejszenie liniowości wiązania wodorowego oraz zwiększoną swobodę kątową między atomami donora i akceptora (O–H–N), wskazującą na bardziej elastyczny, mniej uporządkowany charakter oddziaływania.

Tabela 1: Średnie wartości energii wiązania między grupą dimetyloaminową Bq a Glu65 *c*-pierścienia dla wariantów WT i Asp32Ala. Wszystkie wartości podano w kcal/mol.

Funkcjonał	B3LYP	M06-2X	ω B97XD
6-311++g(d,p)			
WT	$-21,48 \pm 0,77$	$-20,44 \pm 0,21$	$-19,17 \pm 0,41$
Asp32Ala	$-14,42 \pm 0,29$	$-14,64 \pm 0,03$	$-14,32 \pm 0,15$
6-31g(d)			
WT	$-21,60 \pm 0,43$	$-23,37 \pm 0,13$	$-20,19 \pm 0,41$
Asp32Ala	$-14,44 \pm 0,24$	$-14,77 \pm 0,03$	$-16,98 \pm 0,14$

Dodatkowo, na podstawie przedstawionych wyników (Tabela 1) można zauważyć wyraźny wpływ mutacji Asp32Ala na energię wiązania między grupą dimetyloaminową bedakiliny (Bq) a resztą Glu65 *c*-pierścienia. W przypadku wszystkich zastosowanych funkcjonałów (B3LYP, M06-2X, ω B97XD) i dla obu baz (6-311++g(d,p) oraz 6-31g(d)) obserwuje się istotne obniżenie siły wiązania w wariancie Asp32Ala w porównaniu z dzikim typem (WT).



Rysunek 30: Wkład do energia wiązania Bq-F_o wynikający z wiązania wodorowego między grupą dimetyloaminową Bq a Glu65 *c*-pierścienia, w obecności (pomarańczowy) i nieobecności (fioletowy) Asp32, jako funkcja położenia protonu pomiędzy dwoma heteroatomami. Ponieważ położenie protonu jest opisane jako różnica odległości $d_{NH} - d_{OH}$, jej wartości ujemne odpowiadają protonowi znajdującemu się na Bq (konfiguracja zwitterion lub "mostek solny"), a wartości dodatnie odpowiadają protonowi związanemu z *c*-pierścieniem (konfiguracja neutralna). Trójkąty przedstawiają poszczególne energie wiązania obliczone dla 100 geometrii wyodrębnionych losowo z równowagowych symulacji QM/MM. Linia ciągła pokazuje średnią biegnącą, obliczoną oddzielnie dla konfiguracji neutralnej i zwitterion. Przyciąganie elektrostatyczne między przeciwnie naładowanymi jonami jest odpowiedzialne za znaczną część energii wiązania uzyskanej w konfiguracji zwitterion. W rzeczywistości, gdy dwa ładunki elementarne znajdują się w odległości 3,2Å (średnia odległość między centrami ładunku grupy dimetyloaminowej Bq i grupy karboksylowej Glu65), energia oddziaływania elektrostatycznego między nimi wynosi ok. 100 kcal/mol. Rozkłady przedstawione na dole przedstawiają prawdopodobieństwa znalezienia układu przy różnych wartościach $d_{NH} - d_{OH}$, zgodnie z równowagowymi symulacjami QM/MM. Rysunek wykorzystany z pracy [155] na podstawie udzielonej zgody.

Wyniki te jednoznacznie wskazują, że reszta Asp32 odgrywa kluczową rolę w stabilizacji wiązania Bq do Glu65. Usunięcie grupy bocznej asparaginianu znacząco osłabia interakcję, co sugeruje, że tworzenie dodatkowego wiązania wodorowego Asp32-Glu65 w dzikim typie jest istotnym czynnikiem energetycznie sprzyjającym utrzymaniu inhibitora w miejscu wiążącym. Obserwowane osłabienie powinowactwa po mutacji Asp32Ala jest zgodne z hipotezą, że Asp32 wspomaga tworzenie silnego, skróconego wiązania wodorowego (SSHB) między Bq a Glu65, co jest kluczowe dla efektywnej inhibicji rotacji *c*-pierścienia.

Porównanie wariantu dzikiego (WT) oraz mutantu Asp32Ala jednoznacznie wskazuje, że dodatkowe wiązanie wodorowe pomiędzy Glu65 a Asp32, obecne wyłącznie w mykobakteryjnej syntazie ATP, jest warunkiem koniecznym do utworzenia silnego, krótkiego wiązania wodorowego typu SSHB między Bq a Glu65. Obecność tego dodatkowego wiązania stanowi kluczowy element umożliwiający selektywne wiązanie inhibitora.

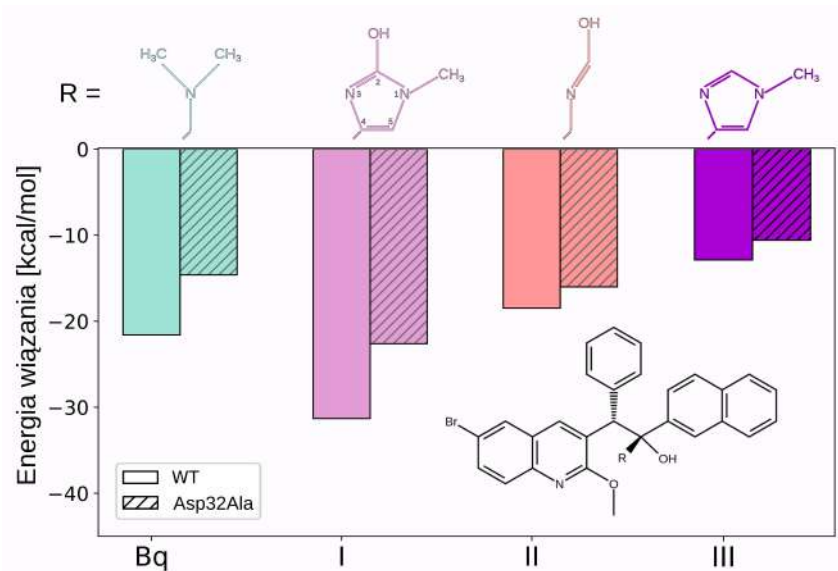
Zjawisko to ilustruje unikalny przypadek silnej kooperatywności dwóch grup karboksylowych – Glu65 i Asp32 – które wspólnie uczestniczą w sieci wiązań wodorowych, znacząco wzmacniając podstawowe wiązanie SSHB. Efekt ten przekłada się na wzrost energii swobodnej wiązania nawet o ponad 7 kcal/mol względem układu pozbawionego tej kooperacji [185].

Biorąc pod uwagę, że reszta Asp32 jest ewolucyjnie zakonserwowana i występuje wyłącznie w *c*-pierścieniu mykobakteryjnych syntaz ATP, można ją uznać za element kluczowy dla specyficzności wiązania Bq, a tym samym dla jej działania przeciwpłatkowego. Znaczenie tej reszty potwierdzają badania nad opornością klinicznych izolatów *Mycobacterium tuberculosis* oraz *Mycobacterium smegmatis*, które wykazały, że mutacje Asp32 na niekwasowe aminokwasy – takie jak walina, glicyna czy alanina – prowadzą do całkowitej utraty odpowiedzi na Bq [76, 186, 59]. Wyniki te dodatkowo podkreślają kluczową rolę Asp32 w mechanizmie selektywnego rozpoznawania i wiązania inhibitora.

Alternatywne możliwości tworzenia silnego wiązania wodorowego

Biorąc pod uwagę uzyskane przeze mnie wyniki, które wskazują, że dodatkowe wiązanie wodorowe pomiędzy Asp32 i Glu65 jest niezbędne do utworzenia krótkiego, silnego wiązania wodorowego (SSHB) z udziałem Bq, zaproponowałam nową strategię projektowania inhibitorów. Celem tej koncepcji było zastąpienie klasycznego wiązania wodorowego między Asp32 a Glu65 — występującego wyłącznie w mykobakteryjnej syntazie ATP — alternatywnym, wewnątrzcząsteczkowym układem donor-akceptor w obrębie samego inhibitora. Dzięki temu możliwe byłoby zachowanie warunków sprzyjających powstaniu SSHB, nawet w białkach pozbawionych reszty Asp32 lub analogicznej.

Zaproponowane modyfikacje strukturalne Bq miałyby na celu poszerzenie spektrum działania na inne bakterie, zarówno Gram-dodatnie (+), jak i Gram-ujemne (–), a także



Rysunek 31: Siła wiązania wodorowego między Bq lub jego trzema analogami (I, II i III) a Glu65 w *c*-pierścieniu WT i jego wariancie Asp32Ala, określona ilościowo jako energia wiązania między grupą tworzącą HB w cząsteczce liganda (R) a parą Glu65/Asp32 (WT) lub samym Glu65 (Asp32Ala).

przeciwdziałanie rozwojowi oporności.

Dotychczasowe próby zwiększenia potencjału terapeutycznego Bq, opisane w literaturze, skupiały się głównie na modyfikacjach rdzenia diarylochinolinowego — przede wszystkim grupy naftyłowej oraz fenyłowej. Niestety, wszystkie te podejścia, wbrew oczekiwaniom, prowadziły do obniżenia aktywności biologicznej [86, 87, 89, 187]. W świetle tych niepowodzeń uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na konieczność zmiany strategii projektowania inhibitorów i zwrócenia większej uwagi na interakcję z konserwowaną resztą Glu65, która odgrywa kluczową rolę w stabilizacji kompleksu.

W związku z tym postawiłam hipotezę, że zapewnienie silnego, kierunkowego wiązania wodorowego z Glu65 — niezależnie od obecności Asp32 — może umożliwić skuteczne tworzenie SSHB i tym samym pozwolić na rozszerzenie zastosowania związków z klasy diarylochinolin. Jest to jednak koncepcja teoretyczna, która nie została jeszcze zweryfikowana doświadczalnie, a jej celem jest przede wszystkim analiza możliwości utworzenia SSHB w układach pozbawionych drugiej grupy karboksylowej z sąsiedniego aminokwasu.

Wraz z członkiem naszego zespołu badawczego, Subrahmanyamem Sappatim, zaprojektowaliśmy trzy analogi Bq, w których grupę aminową zastąpiliśmy odpowiednio: (I) 2-hydroksy-1-metyloimidazolem, (II) pochodną kwasu formamidowego oraz (III) 1-metyloimidazolem. Celem tych modyfikacji było wprowadzenie grup funkcyjnych zdolnych do tworzenia dodatkowego wiązania wodorowego z Glu65, zwiększającego trwałość SSHB.

Energię wiązania wodorowego dla zaprojektowanych związków wyznaczył Subrahmanyam Sappati na podstawie statycznych obliczeń kwantowo-chemicznych, obliczając róż-

nicę między energią pełnego kompleksu a energią izolowanego białka i liganda. Na Rys. 31 przedstawiłam wartości energii wiązania uzyskane dla Bq i analogów (I–III) w wariantcie typu dzikiego (WT) oraz mutantu Asp32Ala. Z porównania widocznego na wykresie wynika jednoznacznie, że najbardziej stabilny kompleks tworzy związek I (ok. -31 kcal/mol w WT), a najsłabszy – związek III (ok. -13 kcal/mol w WT). Bq i analog II w tym zestawieniu zajmują pozycje pośrednie, wykazując odpowiednio energie ok. -22 kcal/mol i -18 kcal/mol.

Wyniki obliczeń sugerują, że związek I ma wyższe powinowactwo do *c*-pierścienia niż oryginalna Bq. Rzeczywiście, jeśli jako wskaźnika użyjemy różnicy w energii wiązania ($\Delta\Delta E = \Delta E_I - \Delta E_{Bq}$), widzimy że związek I tworzy z białkiem dzikim (WT) kompleks stabilniejszy o $9,7$ kcal/mol zaś z mutantem Asp32Ala o $8,0$ kcal/mol (Rys. 31). Otrzymane wartości wskazują zatem, że związek I może być potencjalnie silniejszym inhibitorem niż Bq. Zwiększone powinowactwo można przypisać kooperatywnemu efektowi dwóch wiązań wodorowych: silnego SSHB pomiędzy Glu65 a atomem azotu N3 pierścienia imidazolowego ($d_{ON} = 2,48$ Å) oraz dodatkowego, słabszego wiązania pomiędzy grupą hydroksylową (2-OH) a drugim atomem tlenu w Glu65 ($d_{OO} = 2,76$ Å). Co istotne, to wzmocnienie występuje także w przypadku mutantu Asp32Ala, co sugeruje, że modyfikacja ta może umożliwiać obejście problemu oporności i zachowanie silnego wiązania inhibitora z kompleksem nawet po wyeliminowaniu Asp32.

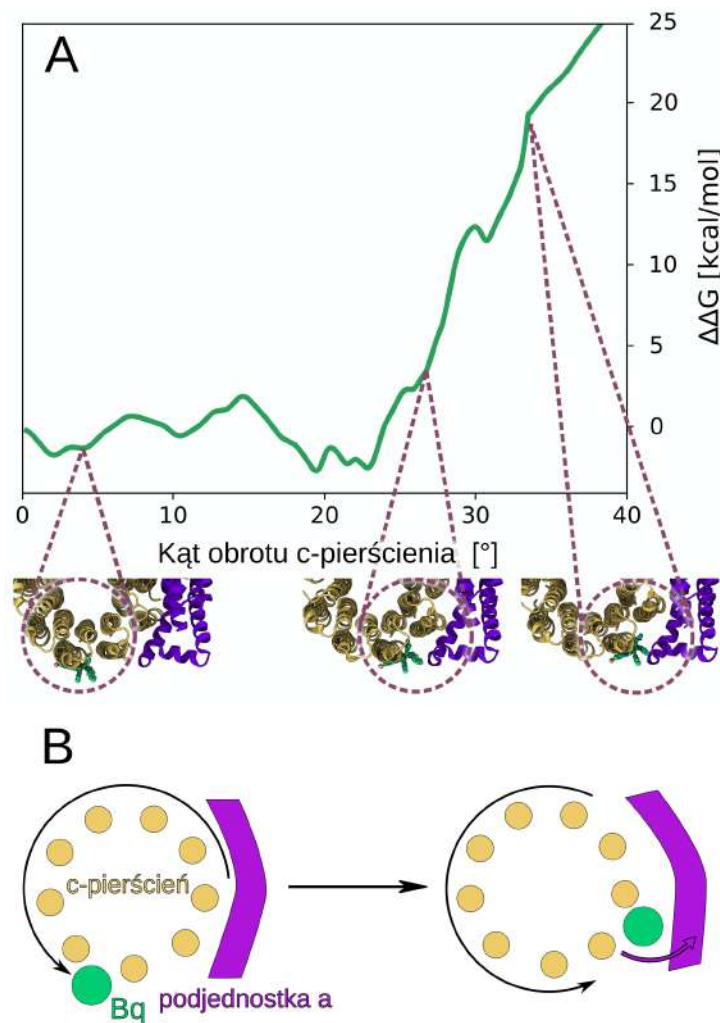
Dla związku III, w którym grupa 2-OH została usunięta, zaobserwowano znaczące osłabienie SSHB i obniżenie energii wiązania. Wynik ten sugeruje, że brak dodatkowego donorowego centrum hydroksylowego czyni tę modyfikację nieefektywną jako potencjalny inhibitor.

W przypadku związku II stwierdzono również spadek energii wiązania w porównaniu do Bq. Może to wynikać z większej elastyczności konformacyjnej podstawionego ugrupowania hydroksyiminowego, które zaburza optymalną geometrię kooperatywnego układu wiązań wodorowych.

Uzyskane dane wskazują, że modyfikacje strukturalne Bq ukierunkowane na utrzymanie lub wzmocnienie SSHB z Glu65 mogą stanowić obiecującą drogę do opracowania nowych, skutecznych związków przeciwbakteryjnych, również przeciwko patogenom niewrażliwym na oryginalną cząsteczkę Bq.

4.2.3 Mechanizm inhibicji syntazy ATP przez bedakilinę

Celem moich badań było także zrozumienie molekularnego mechanizmu działania bedakiliny jako inhibitora części F_o syntazy ATP w mykobakteriach. Wiadomo, że działanie syntazy ATP opiera się na rotacji *c*-pierścienia względem podjednostki *a*, co umożliwia transport protonów i syntezę ATP. Kluczowe dla zrozumienia mechanizmu inhibicji okazało się określenie, w jaki sposób Bq blokuje ten proces w patogenach takich jak *Mycobacterium tuberculosis*.



Rysunek 32: (A) Wpływ Bq na rotacje w obrębie mykobakteryjnego kompleksu F_o wyrażony jako różnica energii swobodnej obrotu w obecności i przy braku Bq związanego z białkiem. (B) Schemat mechanizmu częściowej separacji c -pierścienia i podjednostki a na skutek związania Bq na interfejsie między nimi.

bacterium tuberculosis.

Dotychczas zaproponowano dwie konkurencyjne hipotezy wyjaśniające mechanizm działania Bq. Jedna z nich zakładała, że Bq wiąże się bezpośrednio na interfejsie c -pierścienia/podjednostka a , fizycznie blokując rotację [188]. Alternatywna teoria sugerowała, że Bq działa jako jonoфор, transportując jony H^+ i K^+ przez błonę, co prowadzi do zaburzenia gradientu protonowego i zatrzymania obrotu [101].

Wyniki moich obliczeń QM/MM wskazały na obecność krótkiego, silnego wiązania wodorowego (SSHB) pomiędzy grupą karboksylową Glu65 a dimetyloaminową grupą Bq. Tak silne i selektywne oddziaływanie sugeruje, że Bq działa jako element blokujący rotację c -pierścienia poprzez stabilne przyłączenie do jego powierzchni. Hipoteza ta wymagała jednak bezpośredniego przetestowania – w tym celu obliczyłam profil energii swobodnej rotacji c -pierścienia w funkcji kąta obrotu przy użyciu metody próbkowania parasolkowego

(US).

Przygotowałam dwa zestawy modeli. W pierwszym znajdował się kompleks F_o pozbawiony inhibitora, stanowiący układ referencyjny, natomiast w drugim analogiczny kompleks z Bq związanym na powierzchni *c*-pierścienia. Dla obu systemów niezależnie wyznaczyłam profile energii swobodnej, a ich różnicę ($\Delta\Delta G$) zinterpretowałam jako wpływ obecności inhibitora na energetykę rotacji (Rys. 32).

Jak pokazuje uzyskany przeze mnie profil, kluczowym punktem jest obserwacja gwałtownego wzrostu energii przy kącie rotacji $\sim 23^\circ$, odpowiadającym konfiguracji, w której związana Bq napotyka podjednostkę *a*. Wzrost ten odzwierciedla powstanie bariery energetycznej dla rotacji, wynikającej ze sterycznego odpychania pomiędzy inhibitorem a powierzchnią podjednostki *a*, dodatkowo wzmocnionego obecnością silnego wiązania wodorowego z Glu65. Zerwanie tego wiązania i kontynuacja obrotu jest energetycznie mniej korzystne niż utrzymanie inhibitora w miejscu, co skutecznie zatrzymuje dalszą rotację.

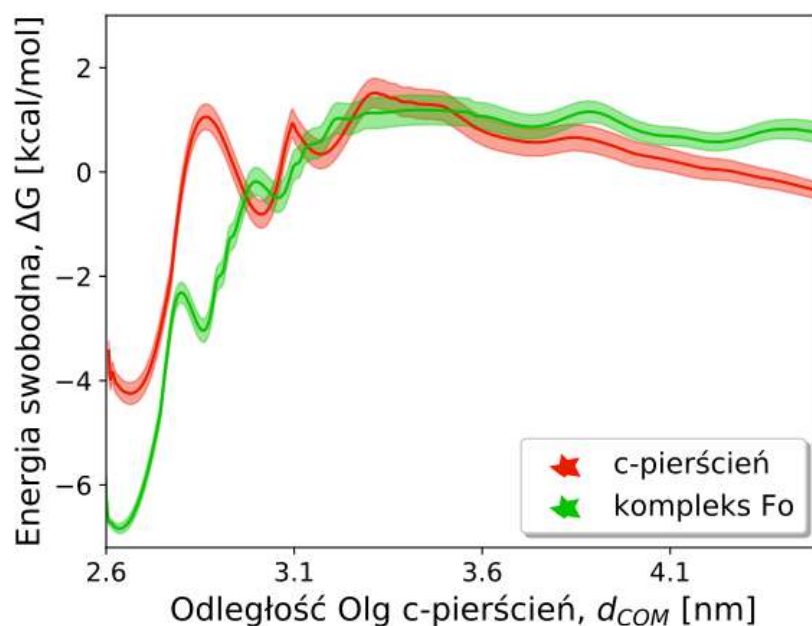
Zgodnie z tą koncepcją, można przewidywać, że obrót *c*-pierścienia zostaje drastycznie spowolniony w momencie, gdy Bq napotyka fizyczną przeszkodę w postaci podjednostki *a*. Oznacza to, że obecność Bq wprowadza do krajobrazu energii swobodnej rotacji znaczącą barierę, skutecznie blokującą dalszy ruch. Kluczowym warunkiem takiego scenariusza jest wystarczająco silne powinowactwo Bq do *c*-pierścienia, co potwierdzają moje analizy układu wiązań wodorowych typu SSHB, zwłaszcza interakcji z Glu65.

Podsumowując, moje badania wskazują, że działanie Bq polega na stabilnym związaniu w kieszeni *c*-pierścienia i wprowadzeniu bariery energetycznej dla jego rotacji względem podjednostki *a*. Oznacza to, że obserwowany mechanizm inhibicji najlepiej opisuje scenariusz blokady interfejsu, wspierany przez silne oddziaływania molekularne, w szczególności SSHB z Glu65, a nie alternatywne działanie jonoforowe.

4.3 Mechanizm wiązania oligomycyny z białkiem F_o

Ze względu na fakt, że obok bedakiliny (Bq) znany jest także inny inhibitor kompleksu F_o syntazy ATP — oligomycyna (Olg) — uznałam za istotne porównanie mechanizmu ich działania. Mimo że są to cząsteczki o zupełnie odmiennej budowie chemicznej i rozmiarach, obie lokalizują się w tym samym miejscu, wiążąc się z powierzchnią *c*-pierścieniem w miejscu występowania kluczowej reszty kwaśnej (Glu). Rodzi to pytanie, czy sposób rozpoznania i oddziaływania z kompleksem F_o , a w konsekwencji mechanizm inhibicji, przebiega w obu przypadkach podobnie, czy też zasadniczo się różni.

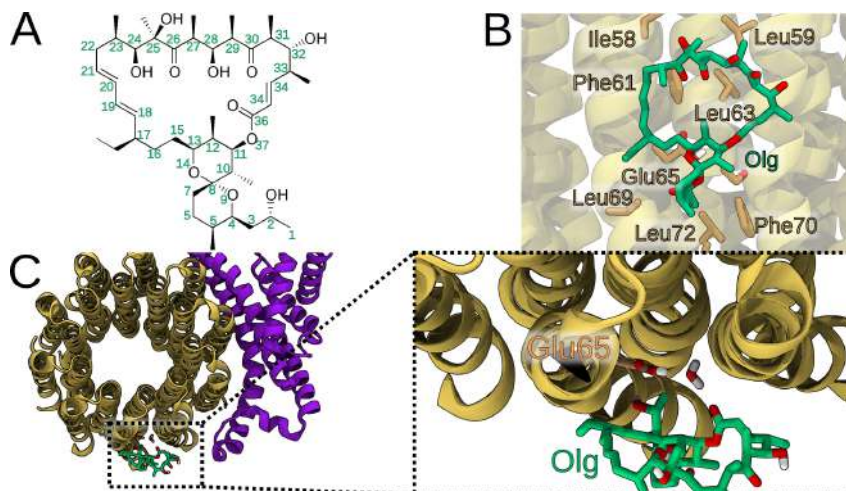
W pierwszej kolejności skoncentrowałam się na określeniu powinowactwa oligomycyny do *c*-pierścienia. W tym celu wyznaczyłam profile energii swobodnej wiązania (PMF) metodą próbkowania parasolkowego (US); jako współrzędną reakcji przyjął odległość między środkami mas ciężkich atomów inhibitora i atomów tworzących kieszeń wiążącą (szczegóły protokołu w rozdziale Metody). Otrzymany profil PMF (Rys. 33) wykazał



Rysunek 33: Porównanie profili energii swobodnej dla wiązania Olg od F_o (d_{COM}) w wariacie izolowanego c -pierścienia (czerwony) i na interfejsie c -pierścienia/podjednostka a (zielony). Współrzędna reakcji została zdefiniowana jako odległość między środkiem masy atomów Olg i środkiem masy ciężkich atomów szkieletu c -pierścienia.

obecność minimum energii swobodnej odpowiadającego kompleksowi Olg- c -pierścień, z wartością rzędu -5 kcal/mol względem stanu zdysocjowanego. Co istotne, krzywe uzyskane dla samego c -pierścienia (czerwony profil) i dla całego kompleksu F_o (zielony profil) są jakościowo zgodne, ale różnią się głębokością minimum: w przypadku izolowanego c -pierścienia wartość minimum jest nieco niższa (ok. 4 kcal/mol), podczas gdy w obecności pełnego kompleksu F_o minimum sięga głębiej (ok. 6 kcal/mol). Wynik ten relatywnie dobrze koresponduje z danymi eksperymentalnymi, wskazującymi na stałą inhibicji Olg rzędu $1 \mu M$, co odpowiada energii swobodnej wiązania ok. -8 kcal/mol [97, 189]. Zgodność powyższa sugeruje, że dla Olg pole siłowe odwzorowuje oddziaływania stabilizujące znacząco lepiej niż w przypadku Bq, dla której obserwowałam znaczne rozbieżności między symulacjami a danymi eksperymentalnymi.

Analiza energetyczna wykazała, że dominujący wkład stabilizujący kompleks Olg- c -pierścień pochodzi od oddziaływań hydrofobowych i dyspersyjnych między alifatycznymi fragmentami Olg a resztami Leu63 i Phe64 (Rys.34B). Dodatkowo zaobserwowałam pojedyncze wiązanie wodorowe (mediowane przez mostkową cząsteczkę wody) łączące grupę karboksylową Glu65 z grupą karbonylową związaną z węglem 36 Olg (Rys. 34C). Udział tej wody w stabilizacji kompleksu sugerowała już struktura krystaliczna (PDB 4F4S) [97]. Moje symulacje potwierdziły taką hipotezę, tym bardziej, że w startowej klatce symulacji cząsteczka ta nie była obecna na interfejsie Olg/białko. W odróżnieniu od Bq, w



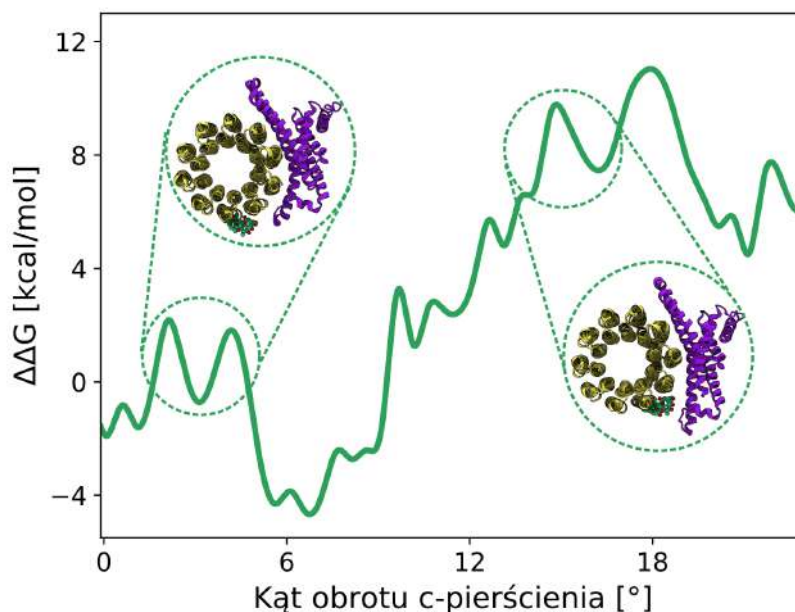
Rysunek 34: (A) Wzór strukturalny Olg z zaznaczonymi numerami atomów łańcucha makrolidowego. (B) Miejsce wiążące Olg w *c*-pierścieniu z zaznaczeniem reszt aminokwasowych kluczowych dla tworzenia kompleksu. (C) Struktura *c*-pierścienia ze związaną Olg z zaznaczoną obecnością mostkującej cząsteczki wody uzyskana w symulacji MD.

przypadku Olg nie stwierdziłam występowania krótkich, silnych wiązań wodorowych – odległości i kąty odpowiadają klasycznym wiązaniom wodorowym. W tym więc przypadku stabilizacja opiera się przede wszystkim na dużej powierzchni kontaktu inhibitor/białko i proporcjonalnej do niej energii oddziaływań dyspersyjnych.

4.4 Mechanizm inhibicji kompleksu F_o na przykładzie oligomycyny

Aby sprawdzić funkcjonalny skutek wiązania Olg na powierzchni *c*-pierścienia, wyznaczyłam także profile energii swobodnej dla jego rotacji względem nieruchomej podjednostki *a*, wykorzystując metodę próbkowania parasolkowego. Wykorzystałam do tego strukturę krystaliczną drożdżowego kompleksu F_o z oligomycyną (PDB 6CP5 [98]). Jako współrzędnej reakcji użyłam kąta obrotu *c*-pierścienia. Aby zbadać wpływ Olg na rotację, wyznaczyłam dwa profile: pierwszy z nich uwzględniał obecność Olg na interfejsie *c*-pierścień/podjednostka *a*, drugi natomiast odpowiadał rotacji bez związanego inhibitora. Na skutek odjęcia od siebie tych dwóch profili energii swobodnej uzyskałam profil podwójnej zmiany energii swobodnej ($\Delta\Delta G$), który zaprezentowałam na Rys. 35.

Analiza tego profilu pokazuje, że w początkowym zakresie rotacji ($0-8^\circ$) obecność Olg nie wpływa istotnie na energetykę ruchu *c*-pierścienia — wartości $\Delta\Delta G$ pozostają niewielkie, nie przekraczając $1-2$ kcal/mol. Oznacza to, że w tym zakresie ruch obrotowy przebiega podobnie niezależnie od obecności inhibitora. Jednak już przy kącie obrotu około 10° obserwuję gwałtowny wzrost energii swobodnej, sięgający 8 kcal/mol. Wraz z dalszą rotacją, w okolicach 25° , pojawia się dodatkowo wyraźne rozdzielenie powierzchni



Rysunek 35: Profile energii rotacji mitochondrialnego kompleksu F_o ze związaną Olg (niebieski) oraz bez (żółty).

kontaktu *c*-pierścieni/podjednostka_a, co wskazuje na destabilizację całego kompleksu.

Warto podkreślić, że wartość bariery rotacyjnej (ok. 8 kcal/mol) jest porównywalna z wartością energii wiązania Olg (5-8 kcal/mol) (Rys.??) [97]. Sugeruje to, że inhibitor jest w stanie utrzymać się w miejscu wiązania także w warunkach, gdy rotujący *c*-pierścień ze związaną Olg napotyka podjednostkę *a*. Innymi słowy, Olg posiada wystarczające powinowactwo, aby „przetrwać” moment, w którym zaczyna on stanowić steryczną przeszkodę dla rotacji. W praktyce oznacza to, że mechanizm działania oligomycyny polega przede wszystkim na trwałym związaniu na interfejsie *c*-pierścieni/podjednostka *a*, które prowadzi do powstania bariery energetycznej blokującej dalszy ruch pierścienia.

Zestawiając te wyniki z wcześniejszymi analizami dla Bq, można stwierdzić, że oba inhibitory – mimo różnic w budowie i właściwościach – wywołują podobny efekt funkcjonalny: wprowadzenie bariery energetycznej, która skutecznie ogranicza rotację *c*-pierścienia. Oznacza to, że zarówno bedakilina, jak i oligomycyna działają poprzez trwałe związanie na interfejsie *c*-pierścieni/podjednostka *a* i fizyczne uniemożliwienie dalszego obrotu. Różnią się natomiast szczegółowym charakterem stabilizujących je interakcji: selektywne krótkie wiązanie wodorowe (SSHB) w przypadku Bq versus kombinacja oddziaływań hydrofobowych i klasycznego wiązania wodorowego (wraz z mostkiem wodnym) w przypadku Olg.

Takie porównanie wskazuje, że mechanizm blokady interfejsu może być uniwersalnym sposobem inhibicji kompleksu F_o, podczas gdy rodzaj oddziaływań molekularnych decyduje o sile, selektywności i specyfice wiązania danego inhibitora.

Wnioski

Celem niniejszej pracy było zrozumienie wybranych aspektów mechanizmu funkcjonowania błonowej części syntazy ATP, białka F_o , oraz wyjaśnienie sposobu jego inhibicji przez dwa różne związki małowcząsteczkowe - oligomycynę i bedalikinę. Do realizacji tego celu wykorzystałam metody komputerowe – pełnoatomową dynamikę molekularną oraz obliczenia hybrydowe QM/MM – które umożliwiły analizę zjawisk trudnych do uchwycenia metodami eksperymentalnymi. W ramach niniejszej pracy skupiałam się na trzech głównych obszarach badań. Jako pierwszy aspekt przeanalizowałam podstawy jednokierunkowej rotacji c -pierścienia białka F_o sprzężonej z transportem protonów w poprzek błony. Przepadałam również mechanizm samego transportu protonów i jego związek z kierunkowością rotacji wspomnianego c -pierścienia. Ponadto ważnym punktem moich badań było scharakteryzowanie molekularnego mechanizmu działania dwóch inhibitorów białka F_o – bedakiliny oraz oligomycyny. Poniżej przedstawiłam najważniejsze wnioski płynące z przeprowadzonych analiz.

Mechanizm rotacji w obrębie kompleksu F_o

Symulacje, które przeprowadziłam, pozwoliły mi określić profile energii swobodnej rotacji c -pierścienia i na ich podstawie pokazać, że kierunek odpowiadający syntezie ATP jest energetycznie korzystniejszy od kierunku odwrotnego. Wykazałam, że zmiany stanów protonacyjnych reszt kwasu glutaminowego w półkanałach bezpośrednio modulują wysokość barier energetycznych rotacji. W szczególności protonacja reszty w półkanale wiążącym (B) obniża koszt przesunięcia jej do hydrofobowego wnętrza błony, podczas gdy opóźniona deprotonacja w półkanale uwalniającym (R) prowadzi do pojawienia się dodatkowej bariery. Oznacza to, że procesy protonacji i deprotonacji poszczególnych reszt w półkanałach wyznaczają kolejne etapy limitujące rotację c -pierścienia, co stanowi mechanistyczne uzupełnienie i potwierdzenie wcześniejszych obserwacji eksperymentalnych [190, 62].

Mechanizm transferu protonów i indukcja jednokierunkowej rotacji c -pierścienia

W niniejszej pracy wykazałam także, że kluczowym etapem mechanizmu rotacyjnego c -pierścienia w kompleksie F_o jest protonacja Glu65 w półkanale wiążącym, która może stanowić etap limitujący szybkość całego procesu. Przeprowadzone przeze mnie symulacje hybrydowe QM/MM ujawniły, że transfer protonu zachodzi zgodnie z mechanizmem tzw. dziury protonowej (*proton hole mechanism*). W tym mechanizmie protonacja akceptora (Glu65 c -pierścienia) następuje równocześnie z powstaniem lokalnego deficytu protonu (OH^-), który propaguje się wzdłuż szlaku wodnego w kierunku donora (Glu223 podjednostki a). Taki sposób transferu może mieć istotne konsekwencje dla zależności energetycznej i synchronizacji między zmianami protonacji a obrotem c -pierścienia.

Wpływ zakonserwowanej argininy na kierunkowość rotacji

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy analizy jednoznacznie wskazały kluczową rolę reszty Arg176 w podjednostce a kompleksu F_o w zachowaniu kierunkowości rotacji c -pierścienia. Pokazałam, że obecność tego aminokwasu umożliwia rozdzielenie dwóch półkanałów protonowych i stabilizację preferencji rotacji w kierunku syntezy ATP. Jest to ważne ze względu na wydajne sprzężenie transportu protonów z konwersją energii elektrochemicznej w mechaniczną. Jednocześnie wykazałam, że mutacje tej reszty prowadzą do utraty kinetycznej preferencji do rotacji w kierunku syntezy ATP, co skutkuje obniżeniem funkcjonalności całego kompleksu. Zaprezentowane przeze mnie wyniki dostarczają mechanistycznego wyjaśnienia wcześniejszych obserwacji eksperymentalnych i wyraźnie pokazują, że zakonserwowana Arg176 jest elementem niezbędnym do wydajnego sprzężenia transportu protonów z rotacją kompleksu F_o [98].

Wpływ inhibitora na rotację kompleksu F_o na przykładzie bedakiliny

Moje badania nad oddziaływaniami bedakiliny (Bq) z syntazą ATP wykazały, że inhibitor ten skutecznie blokuje rotację c -pierścienia względem nieruchomej podjednostki a . Pierwsze strukturalne dowody uzyskano w 2015 roku dzięki krystalografii rentgenowskiej (PDB: 4V1F) [21], która ujawniła lokalizację bedakiliny na powierzchni c -pierścienia kompleksu F_o z *Mycobacterium phlei*. Mimo tego przełomowego odkrycia, mechanizm molekularny wiązania inhibitora pozostawał niejasny. Wyniki symulacji przeprowadzonych przeze mnie w niniejszej pracy wykazały, że Bq wiąże się na interfejsie c -pierścienia i podjednostki a , a jej obecność skutecznie uniemożliwia rotację c -pierścienia w kierunku syntezy ATP. W konsekwencji hamuje to sprzężenie przepływu protonów z obrotem i zatrzymuje działanie silnika protonowego.

Analiza silnego wiązania wodorowego w aspekcie inhibicji kompleksu F_o przez bedakilinę

Dowiodłam, że kluczowym elementem zapewniającym skuteczność bedakiliny jako leku jest możliwość utworzenia krótkiego, silnego wiązania wodorowego (SSHB) z zakonserwowaną resztą Glu65 w c -pierścieniu. Symulacje i analizy, które przeprowadziłam, znajdują odzwierciedlenie w danych krystalograficznych [83]. Stabilizacja tego oddziaływania jest dodatkowo wzmacniana przez unikalną dla mykobakterii resztę Asp32, co tłumaczy specyficzność inhibitora względem syntazy ATP pochodzącej z mykobakterii. Analizy energetyczne przeprowadzone przeze mnie w ramach niniejszej pracy wykazały, że ważną rolę w stabilizacji kompleksu Bq/ F_o odgrywają także oddziaływania dyspersyjne, głównie z resztami Tyr68, Phe69 i Ile70, które współdziałają z aromatycznymi fragmentami bedakiliny, jednak ich obecność jest niewystarczająca. Wykazałam, że SSHB jest kluczowe dla tego kompleksu, wzmacniając te oddziaływania, zapewniając inhibitorowi wyjątkową trwałość wiązania w hydrofobowym środowisku błony lipidowej.

Mechanizm inhibicji syntazy ATP przez bedakilinę

Wyniki, które zebrałam, pozwalają zaproponować spójny mechanizm inhibicji syntazy

ATP przez bedakilinę. Inhibitor wiąże się w błonie z *c*-pierścieniem, tworząc kluczowe SSHB z Glu65 oraz dodatkowe oddziaływania dyspersyjne z resztami sąsiadującymi. Stabilizacja ta powoduje, że w momencie kontaktu Bq z interfejsem *c*-pierścień/podjednostka *a* następuje zablokowanie rotacji *c*-pierścienia, uniemożliwiając translokację protonów pomiędzy półkanałami i tym samym zatrzymując konwersję energii chemiosmotycznej w mechaniczną. Co istotne, wykazałam, że mutacje w pozycji Asp32 osłabiają SSHB, co potwierdza kluczową rolę tej reszty w mechanizmie wiązania. W szerszym kontekście wyniki te podkreślają znaczenie krótkich, silnych wiązań wodorowych jako potencjalnych determinantów skuteczności innych inhibitorów. Sugerują także, że projektowanie analogów Bq zachowujących zdolność do tworzenia SSHB z Glu65 może stanowić obiecującą strategię w opracowywaniu nowych leków o poszerzonym spektrum działania wobec syntazy ATP w różnych patogenach.

Mechanizm inhibicji syntazy ATP przez oligomycynę

W ramach badań nad oligomycyną (Olg) określiłam molekularne determinanty jej wiązania z powierzchnią *c*-pierścienia i porównałam je z ustalonymi wcześniej dla bedakiliny. Analiza profili energetycznych dla wiązania Olg pokazała, że stabilizacja kompleksu oligomycyny z *c*-pierścieniem wynika przede wszystkim z oddziaływań dyspersyjnych oraz (zwykłego) wiązania wodorowego. Konkretyzując, kluczowe znaczenie mają kontakty pomiędzy alifatycznymi fragmentami oligomycyny a resztami Leu63 i Phe64 oraz mostkowe wiązanie wodorowe pomiędzy Glu65 i grupą hydroksylową oligomycyny, pośredniczone przez cząsteczkę wody. W odróżnieniu od bedakiliny, której mechanizm opiera się na krótkim, silnym wiązaniu wodorowym (SSHB), oligomycyna wykorzystuje raczej rozległą powierzchnię hydrofobową i standardowe oddziaływania niekowalencyjne. Moje wyniki wskazują, że obecność oligomycyny w kompleksie F_o prowadzi do powstania wyraźnej bariery energetycznej, która blokuje rotację *c*-pierścienia i tym samym uniemożliwia działanie syntazy ATP. Obliczona energia swobodna wiązania (ok. -6 kcal/mol) pozostaje w relatywnie dobrej zgodności z danymi eksperymentalnymi (stała inhibicji w zakresie ok. $1 \mu\text{M}$ [189]), co potwierdza poprawność zastosowanego modelu.

Moje badania pokazują, że zarówno w przypadku Bq, jak i Olg, zatrzymanie rotacji następuje w momencie kontaktu inhibitora z podjednostką *a*, co wskazuje na wspólny sposób inhibicji syntazy. Bedakilina wiąże się poprzez utworzenie krótkiego, silnego wiązania wodorowego (SSHB) z Glu65 — wiązania o nietypowo dużej sile stabilizującej w porównaniu z klasycznym H-wiązaniem — które w istotny sposób przyczynia się do jej wysokiego powinowactwa i specyficzności. Oligomycyna natomiast stabilizuje kompleks głównie poprzez rozległe oddziaływania dyspersyjne oraz klasyczne wiązanie wodorowe z Glu65 z pośredniczącą cząsteczką wody. Dodatkowo jej rozmiar i ułożenie na interfejsie fizycznie blokują ruch *c*-pierścienia, działając jako przeszkoda steryczna. Innymi słowy, Bq i Olg wykorzystują różne zestawy oddziaływań molekularnych — odpowiednio: silne,

krótkie wiązanie wodorowe kontra szerokie kontakty dyspersyjne — lecz oba prowadzą do tego samego efektu funkcjonalnego: zatrzymania rotacji *c*-pierścienia i zahamowania transportu protonów.

Przeprowadzone badania dostarczyły nowego wglądu w mechanizmy bioenergetyczne, trudne do uchwycenia wyłącznie metodami eksperymentalnymi, i pokazały kluczową rolę symulacji pełnoatomowej dynamiki molekularnej oraz metod QM/MM w analizie mechanochemicznego działania białek błonowych. Uzyskane wyniki mogą stanowić punkt wyjścia do projektowania nowych inhibitorów syntazy ATP – zarówno selektywnych wobec wariantów bakteryjnych, jak i skierowanych przeciwko mitochondriom.

Bibliografia

- [1] P. D. Boyer, “The atp synthase—a splendid molecular machine,” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 66, no. Volume 66, 1997, pp. 717–749, 1997.
- [2] M. Bonora, S. Patergnani, A. Rimessi, E. De Marchi, J. Suski, A. Bononi, C. Giorgi, S. Marchi, S. Missiroli, F. Poletti, M. Wieckowski, and P. Pinton, “Atp synthesis and storage,” *Purinergic signalling*, vol. 8, pp. 343–57, 04 2012.
- [3] W. Kühlbrandt, “Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases,” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 88, no. 1, pp. 515–549, 2019.
- [4] D. Okuno, R. Iino, and H. Noji, “Rotation and structure of FoF1-ATP synthase,” *The Journal of Biochemistry*, vol. 149, pp. 655–664, 04 2011.
- [5] J. Walker, “The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown,” *Biochemical Society Transactions*, vol. 41, pp. 1–16, 01 2013.
- [6] A. Hahn, J. Vonck, D. J. Mills, T. Meier, and W. Kühlbrandt, “Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase,” *Science*, vol. 360, no. 6389, p. eaat4318, 2018.
- [7] A. P. Srivastava, M. Luo, W. Zhou, J. Symersky, D. Bai, M. G. Chambers, J. D. Faraldo-Gómez, M. Liao, and D. M. Mueller, “High-resolution cryo-EM analysis of the yeast ATP synthase in a lipid membrane,” *Science*, vol. 360, no. 6389, p. eaas9699, 2018.
- [8] H. Guo, S. A. Bueler, and J. L. Rubinstein, “Atomic model for the dimeric FO region of mitochondrial ATP synthase,” *Science*, vol. 358, pp. 936–940, nov 2017.
- [9] A. W. Mühleip, F. Joos, C. Wigge, A. S. Frangakis, W. Kühlbrandt, and K. M. Davies, “Helical arrays of U-shaped ATP synthase dimers form tubular cristae in ciliate mitochondria,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 113, no. 30, pp. 8442–8447, 2016.
- [10] H. Guo, S. A. Bueler, and J. L. Rubinstein, “Atomic model for the dimeric FO region of mitochondrial ATP synthase,” *Science*, vol. 358, no. 6365, pp. 936–940, 2017.
- [11] M. J. van Raaij, J. P. Abrahams, A. G. Leslie, and J. E. Walker, “The structure of bovine f1-atpase complexed with the antibiotic inhibitor aurovertin b.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93, no. 14, pp. 6913–6917, 1996.

- [12] W. Junge and N. Nelson, “ATP Synthase,” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 84, no. 1, pp. 631–657, 2015.
- [13] Noji Hiroyuki, Yasuda Ryohei, Yoshida Masasuke, and Kinosita Jr Kazuhiko, “Direct observation of the rotation of F1-ATPase,” *Nature*, vol. 386, no. March, pp. 299–302, 1997.
- [14] M. Diez, B. Zimmermann, M. Boersch, M. Koenig, E. Schweinberger, S. Steigmiller, R. Reuter, S. Felekyan, V. Kudryavtsev, C. Seidel, and P. Gräber, “Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound FOF1-ATP synthase,” *Nature structural molecular biology*, vol. 11, pp. 135–41, 03 2004.
- [15] K. Kinosita, K. Adachi, and H. Itoh, “Rotation of F1-ATPase: How an ATP-Driven Molecular Machine May Work,” *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 33, no. 1, pp. 245–268, 2004.
- [16] J. Abrahams, A. Leslie, R. Lutter, and J. Walker, “Structure of F1-ATPase from Bovine Heart Mitochondria,” *Nature*, vol. 370, pp. 621–8, 09 1994.
- [17] D. Sabbert, S. Engelbrecht, and W. Junge, “Functional and idling rotatory motion within F1-ATPase,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 9, pp. 4401–4405, 1997.
- [18] R. Yasuda, H. Noji, M. Yoshida, K. Kinosita, and H. Itoh, “Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase,” *Nature*, vol. 410, pp. 898–904, 05 2001.
- [19] M. Sobti, H. Uenno, H. Noji, and A. Stewart, “The six steps of the complete f1-atpase rotary catalytic cycle,” *Nature Communications*, vol. 12, 08 2021.
- [20] D. Pogoryelov, J. Yu, T. Meier, J. Vonck, P. Dimroth, and D. J. Muller, “The c15 ring of the *Spirulina platensis* F-ATP synthase: F1/F0 symmetry mismatch is not obligatory,” *EMBO reports*, vol. 6, no. 11, pp. 1040–1044, 2005.
- [21] L. Preiss, J. D. Langer, Ö. Yildiz, L. Eckhardt-Strelau, J. E. Guillemont, A. Koul, and T. Meier, “Structure of the mycobacterial ATP synthase Fo rotor ring in complex with the anti-TB drug bedaquiline,” *Science Advances*, vol. 1, no. 4, pp. 1–9, 2015.
- [22] H. Guo, T. Suzuki, and J. L. Rubinstein, “Structure of a bacterial ATP synthase,” *eLife*, vol. 8, p. e43128, feb 2019.
- [23] A. D. Becke, “Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 98, pp. 5648–5652, 04 1993.

- [24] C. von Ballmoos, T. Meier, and P. Dimroth, “Membrane embedded location of Na⁺ or H⁺ binding sites on the rotor ring of F1F0 ATP synthases,” *European Journal of Biochemistry*, vol. 269, no. 22, pp. 5581–5589, 2002.
- [25] I. N. Watt, M. G. Montgomery, M. J. Runswick, A. G. W. Leslie, and J. E. Walker, “Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 39, pp. 16823–16827, 2010.
- [26] J. Weber, “Atp synthase – the structure of the stator stalk,” *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 32, no. 2, pp. 53–56, 2007.
- [27] K. Brandt, S. Maiwald, B. Herkenhoff-Hesselmann, K. Gnirß, J.-C. Greie, S. Dunn, and G. Deckers-Hebestreit, “Individual interactions of the b subunits within the stator of the escherichia coli atp synthase,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 288, 07 2013.
- [28] A. Zhou, A. Rohou, D. G. Schep, J. V. Bason, M. G. Montgomery, J. E. Walker, N. Grigorieff, and J. L. Rubinstein, “Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by cryo-EM,” *eLife*, vol. 4, p. e10180, oct 2015.
- [29] W. Kühlbrandt and K. M. Davies, “Rotary ATPases: A New Twist to an Ancient Machine,” *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 41, no. 1, pp. 106–116, 2016. Special Issue: 40 Years of TiBS.
- [30] W. Zhou, V. Leone, A. Krah, and J. D. Faraldo-Gómez, “Predicted Structures of the Proton-Bound Membrane-Embedded Rotor Rings of the *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* ATP Synthases,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 121, no. 15, pp. 3297–3307, 2017.
- [31] A. Hahn, K. Parey, M. Bublitz, D. Mills, V. Zickermann, J. Vonck, W. Kühlbrandt, and T. Meier, “Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology,” *Molecular Cell*, vol. 63, no. 3, pp. 445–456, 2016.
- [32] T. E. Spikes, M. G. Montgomery, and J. E. Walker, “Structure of the dimeric ATP synthase from bovine mitochondria,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 117, no. 38, pp. 23519–23526, 2020.
- [33] S. P. Tsunoda, A. J. W. Rodgers, R. Aggeler, M. C. J. Wilce, M. Yoshida, and R. A. Capaldi, “Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F1F0 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme,”

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no. 12, pp. 6560–6564, 2001.
- [34] D. Pogoryelov, Y. Nikolaev, U. Schlattner, K. Pervushin, P. Dimroth, and T. Meier, “Probing the rotor subunit interface of the atp synthase from *ilyobactertartaricus*,” *The FEBS Journal*, vol. 275, no. 19, pp. 4850–4862, 2008.
 - [35] K. ichi Okazaki and G. Hummer, “Elasticity, friction, and pathway of γ -subunit rotation in FoF1-ATP synthase,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 34, pp. 10720–10725, 2015.
 - [36] Y. Kagawa and E. Racker, “Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation: Ix. reconstruction of oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 241, no. 10, pp. 2467–2474, 1966.
 - [37] R. Yasuda, H. Noji, K. Kinoshita, and M. Yoshida, “F1-atpase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps,” *Cell*, vol. 93, no. 7, pp. 1117–1124, 1998.
 - [38] R. Watanabe, K. Tabata, R. Iino, H. Uenno, M. Iwamoto, S. Oiki, and H. Noji, “Biased Brownian stepping rotation of FoF1-ATP synthase driven by proton motive force,” *Nature communications*, vol. 4, p. 1631, 03 2013.
 - [39] K. Shimabukuro, R. Yasuda, E. Muneyuki, K. Y. Hara, K. Kinoshita, and M. Yoshida, “Catalysis and rotation of F1 motor: cleavage of ATP at the catalytic site occurs in 1 ms before 40 degree substep rotation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, no. 25, pp. 14731–14736, 2003.
 - [40] T. Suzuki, K. Tanaka, C. Wakabayashi, E.-i. Saita, and M. Yoshida, “Chemomechanical coupling of human mitochondrial F1-ATPase motor,” *Nature chemical biology*, vol. 10, pp. 930–936, 09 2014.
 - [41] R. Kobayashi, H. Ueno, C.-B. Li, and H. Noji, “Rotary catalysis of bovine mitochondrial F1-ATPase studied by single-molecule experiments,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 117, no. 3, pp. 1447–1456, 2020.
 - [42] S. Volkán-Kacsó, L. Q. Le, K. Zhu, H. Su, and R. A. Marcus, “Method to extract multiple states in F1-ATPase rotation experiments from jump distributions,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 116, no. 51, pp. 25456–25461, 2019.
 - [43] R. Menz, J. Walker, and A. Leslie, “Structure of bovine mitochondrial f(1)-atpase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis,” *Cell*, vol. 106, no. 3, p. 331–341, 2001.

- [44] A. Meyrat and C. von Ballmoos, “ATP synthesis at physiological nucleotide concentrations,” *Scientific Reports*, vol. 9, p. 3070, 02 2019.
- [45] D. Bald and A. Koul, “Respiratory ATP synthesis: the new generation of mycobacterial drug targets?,” *FEMS Microbiology Letters*, vol. 308, pp. 1–7, 07 2010.
- [46] O. Pänke, D. A. Cherepanov, K. Gumbiowski, S. Engelbrecht, and W. Junge, “Viscoelastic dynamics of actin filaments coupled to rotary f-atpase: Angular torque profile of the enzyme,” *Biophysical Journal*, vol. 81, no. 3, pp. 1220–1233, 2001.
- [47] S. Toyabe, T. Watanabe-Nakayama, T. Okamoto, S. Kudo, and E. Muneyuki, “Thermodynamic efficiency and mechanochemical coupling of f1-atpase,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 44, pp. 17951–17956, 2011.
- [48] R. D. Vale and R. A. Milligan, “The way things move: Looking under the hood of molecular motor proteins,” *Science*, vol. 288, no. 5463, pp. 88–95, 2000.
- [49] Z.-H. He, R. Bottinelli, M. A. Pellegrino, M. A. Ferenczi, and C. Reggiani, “ATP Consumption and Efficiency of Human Single Muscle Fibers with Different Myosin Isoform Composition,” *Biophysical Journal*, vol. 79, no. 2, pp. 945–961, 2000.
- [50] N. Klusch, B. J. Murphy, D. J. Mills, Yildiz, and W. Kühlbrandt, “Structural basis of proton translocation and force generation in mitochondrial ATP synthase,” *eLife*, vol. 6, p. e33274, dec 2017.
- [51] K. Hards, J. R. Robson, M. Berney, L. Shaw, D. Bald, A. Koul, K. Andries, and G. M. Cook, “Bactericidal mode of action of bedaquiline,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 70, pp. 2028–2037, 03 2015.
- [52] W. Junge, H. Lill, and S. Engelbrecht, “ATP synthase: an electrochemical ransducer with rotatory mechanics,” *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 22, no. 11, pp. 420–423, 1997.
- [53] T. Meier, J. Yu, T. Raschle, F. Henzen, P. Dimroth, and D. J. Muller, “Structural evidence for a constant c11 ring stoichiometry in the sodium f-atp synthase,” *The FEBS Journal*, vol. 272, no. 21, pp. 5474–5483, 2005.
- [54] A. Marciniak, P. Chodnicki, K. A. Hossain, J. Slabonska, and J. Czub, “Determinants of directionality and efficiency of the atp synthase fo motor at atomic resolution,” *The Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 13, no. 1, pp. 387–392, 2022.

- [55] S. Eya, M. Maeda, and M. Futai, "Role of the carboxyl terminal region of H⁺-ATPase (F0F1a subunit from *Escherichia coli*," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 284, no. 1, pp. 71–77, 1991.
- [56] B. D. Cain and R. D. Simoni, "Interaction between Glu-219 and His-245 within the a subunit of F1F0-ATPase in *Escherichia coli*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, no. 14, pp. 6606–6612, 1988.
- [57] S. Nesci, V. Ventrella, F. Trombetti, M. Pirini, and A. Pagliarani, "Thiol oxidation of mitochondrial FO-c subunits: A way to switch off antimicrobial drug targets of the mitochondrial ATP synthase," *Medical Hypotheses*, vol. 83, no. 2, pp. 160–165, 2014.
- [58] A. C. Haagsma, R. Abdillahi-Ibrahim, M. J. Wagner, K. Krab, K. Vergauwen, J. Guillemon, K. Andries, H. Lill, A. Koul, and D. Bald, "Selectivity of TMC 207 towards Mycobacterial ATP Synthase Compared with That towards the Eukaryotic Homologue," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 53, no. 3, pp. 1290–1292, 2009.
- [59] E. Segala, W. Sougakoff, A. Nevejans-Chauffour, V. Jarlier, and S. Petrella, "New mutations in the mycobacterial ATP synthase: New insights into the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase C-Ring structure," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, no. 5, pp. 2326–2334, 2012.
- [60] M. Sobti, J. L. Walshe, D. Wu, R. Ishmukhametov, Y. C. Zeng, C. V. Robinson, R. M. Berry, and A. G. Stewart, "Cryo-EM structures provide insight into how *E. coli* F1Fo ATP synthase accommodates symmetry mismatch," *Nature communications*, vol. 11, p. 2615, May 2020.
- [61] R. H. Fillingame, C. M. Angevine, and O. Y. Dmitriev, "Coupling proton movements to c-ring rotation in F1Fo ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the a–c interface," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1555, no. 1, pp. 29–36, 2002. 12th European Bioenergetics Conference.
- [62] S. Yanagisawa and W. D. Frasch, "pH-dependent 11° F1FO ATP synthase sub-steps reveal insight into the FO torque generating mechanism," *eLife*, vol. 10, p. e70016, dec 2021.
- [63] G. Deckers-Hebestreit and K. Altendorf, "The f0 complex of the proton-translocating f-type atpase of *Escherichia coli*," *Journal of Experimental Biology*, vol. 172, pp. 451–459, 11 1992.
- [64] S. Mukherjee and A. Warshel, "Realistic simulations of the coupling between the protomotive force and the mechanical rotation of the F_0 subunit,"

- atpase,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 37, pp. 14876–14881, 2012.
- [65] C. Bai and A. Warshel, “Revisiting the protomotive vectorial motion of f_0 -atpase,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 116, no. 39, pp. 19484–19489, 2019.
- [66] J. Xing, H. Wang, C. von Ballmoos, P. Dimroth, and G. Oster, “Torque Generation by the F_0 motor of the Sodium ATPase,” *Biophysical Journal*, vol. 87, no. 4, pp. 2148–2163, 2004.
- [67] F. Wehrle, G. Kaim, and P. Dimroth, “Molecular Mechanism of the ATP Synthase’s F_0 Motor Probed by Mutational Analyses of Subunit a,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 322, no. 2, pp. 369–381, 2002.
- [68] N. Mitome, S. Ono, H. Sato, T. Suzuki, N. Sone, and M. Yoshida, “Essential arginine residue of the F_0 -a subunit in F_0F_1 -ATP synthase has a role to prevent the proton shortcut without c-ring rotation in the F_0 proton channel,” *Biochemical Journal*, vol. 430, pp. 171–177, 07 2010.
- [69] P. Dimroth, H. Wang, M. Grabe, and G. Oster, “Energy transduction in the sodium F-ATPase of *Propionigenium modestum*,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96, no. 9, pp. 4924–4929, 1999.
- [70] T. Elston, H. Wang, and G. Oster, “Energy transduction in ATP synthase,” *Nature*, vol. 391, pp. 510–3, 02 1998.
- [71] D. Pogoryelov, A. Krah, J. Langer, Yildiz, J. Faraldo-Gómez, and T. Meier, “Microscopic rotary mechanism of ion translocation in the F_0 complex of ATP synthases,” *Nature chemical biology*, vol. 6, pp. 891–9, 10 2010.
- [72] L. Bae and S. B. Vik, “A more robust version of the arginine 210-switched mutant in subunit a of the escherichia coli atp synthase,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1787, p. 1129–1134, September 2009.
- [73] S. B. Vik and B. J. Antonio, “A mechanism of proton translocation by F_1F_0 ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 48, pp. 30364–30369, 1994.
- [74] V. K. Rastogi and M. E. Girvin, “Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase,” *Nature*, vol. 402, no. 6759, pp. 263–268, 1999.

- [75] A. Aksimentiev, I. A. Balabin, R. H. Fillingame, and K. Schulten, “Insights into the Molecular Mechanism of Rotation in the Fo Sector of ATP Synthase,” *Biophysical Journal*, vol. 86, no. 3, pp. 1332–1344, 2004.
- [76] K. Andries, P. Verhasselt, J. Guillemont, H. W. H. Göhlmann, J.-M. Neefs, H. Winkler, J. V. Gestel, P. Timmerman, M. Zhu, E. Lee, P. Williams, D. de Chaffoy, E. Huitric, S. Hoffner, E. Cambau, C. Truffot-Pernot, N. Lounis, and V. Jarlier, “A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of *Mycobacterium tuberculosis*,” *Science*, vol. 307, no. 5707, pp. 223–227, 2005.
- [77] C. Gerle, C. Jiko, A. Nakano, K. Yokoyama, C. C. Gopalasingam, H. Shigematsu, and K. Abe, “Human f-atp synthase as a drug target,” *Pharmacological Research*, vol. 209, p. 107423, 2024.
- [78] P. Lu, H. Lill, and D. Bald, “ATP synthase in mycobacteria: Special features and implications for a function as drug target,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1837, no. 7, pp. 1208–1218, 2014. 18th European Bioenergetics Conference 2014 Lisbon, Portugal.
- [79] A. H. Diacon, A. Pym, M. P. Grobusch, J. M. de los Rios, E. Gotuzzo, I. Vasilyeva, V. Leimane, K. Andries, N. Bakare, T. De Marez, M. Haxaire-Theeuwes, N. Lounis, P. Meyvisch, E. De Paepe, R. P. van Heeswijk, and B. Dannemann, “Multidrug-resistant tuberculosis and culture conversion with bedaquiline,” *New England Journal of Medicine*, vol. 371, no. 8, pp. 723–732, 2014.
- [80] M. Ibrahim, K. Andries, N. Lounis, A. Chauffour, C. Truffot-Pernot, V. Jarlier, and N. Veziris, “Synergistic activity of r207910 combined with pyrazinamide against murine tuberculosis,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 51, no. 3, pp. 1011–1015, 2007.
- [81] P. M. Njogu, E. M. Guantai, E. Pavadai, and K. Chibale, “Computer-aided drug discovery approaches against the tropical infectious diseases malaria, tuberculosis, trypanosomiasis, and leishmaniasis,” *ACS Infectious Diseases*, vol. 2, no. 1, pp. 8–31, 2016.
- [82] S. Tiberi, M. Muñoz-Torrico, R. Duarte, M. Dalcolmo, L. D’Ambrosio, and G.-B. Migliori, “New drugs and perspectives for new anti-tuberculosis regimens,” *Pulmonology*, vol. 24, no. 2, pp. 86–98, 2018. World TB day 2018: targeting tuberculosis.
- [83] H. Guo, G. M. Courbon, S. A. Bueler, J. Mai, J. Liu, and J. L. Rubinstein, “Structure of mycobacterial ATP synthase bound to the tuberculosis drug bedaquiline,” *Nature*, vol. 589, no. 7840, pp. 143–147, 2021.

- [84] A. Blaser, H. S. Sutherland, A. S. Tong, P. J. Choi, D. Conole, S. G. Franzblau, C. B. Cooper, A. M. Upton, M. Lotlikar, W. A. Denny, and B. D. Palmer, "Structure-activity relationships for unit c pyridyl analogues of the tuberculosis drug bedaquiline," *Bioorganic Medicinal Chemistry*, vol. 27, no. 7, pp. 1283–1291, 2019.
- [85] J. He, H. C. Ford, J. Carroll, C. Douglas, E. Gonzales, S. Ding, I. M. Fearnley, and J. E. Walker, "Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 115, no. 12, pp. 2988–2993, 2018.
- [86] C. He, L. Preiss, B. Wang, L. Fu, H. Wen, X. Zhang, H. Cui, T. Meier, and D. Yin, "Structural Simplification of Bedaquiline: The Discovery of 3-(4-(N,N-Dimethylaminomethyl)phenyl)quinoline-Derived Antitubercular Lead Compounds," *ChemMedChem*, vol. 12, 10 2016.
- [87] W. Balemans, L. Vranckx, N. Lounis, O. Pop, J. Guillemont, K. Vergauwen, S. Mol, R. Gilissen, M. Motte, D. Lançois, M. De Bolle, K. Bonroy, H. Lill, K. Andries, D. Bald, and A. Koul, "Novel antibiotics targeting respiratory ATP synthesis in gram-positive pathogenic bacteria," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, no. 8, pp. 4131–4139, 2012.
- [88] P. Liu, S. Fan, B. Wang, R. Cao, X. Wang, S. Li, Y. Lu, and W. Zhong, "Design, synthesis and biological evaluation of novel triaryldimethylaminobutan-2-ol derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*," *Bioorganic Chemistry*, vol. 102, no. March, pp. 1–13, 2020.
- [89] A. S. Tong, P. J. Choi, A. Blaser, H. S. Sutherland, S. K. Tsang, J. Guillemont, M. Motte, C. B. Cooper, K. Andries, W. Van Den Broeck, S. G. Franzblau, A. M. Upton, W. A. Denny, B. D. Palmer, and D. Conole, "6-Cyano Analogues of Bedaquiline as Less Lipophilic and Potentially Safer Diarylquinolines for Tuberculosis," *ACS Medicinal Chemistry Letters*, vol. 8, no. 10, pp. 1019–1024, 2017.
- [90] A. C. Haagsma, I. Podasca, A. Koul, K. Andries, J. Guillemont, H. Lill, and D. Bald, "Probing the Interaction of the Diarylquinoline TMC207 with Its Target Mycobacterial ATP Synthase," *PLOS ONE*, vol. 6, pp. 1–7, 08 2011.
- [91] J. P. Sarathy, P. Ragunathan, J. Shin, C. B. Cooper, A. M. Upton, G. Grüber, and T. Dick, "TBAJ-876 Retains Bedaquiline's Activity against Subunits c and of *Mycobacterium tuberculosis* F-ATP Synthase," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 63, no. 10, pp. 10.1128/aac.01191–19, 2019.
- [92] R. Patel, R. Saeed, and S. W. Park, "Bedaquiline: A new hope to treat multi-drug resistant tuberculosis," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 14, 09 2014.

- [93] Y. Saga, R. Motoki, S. Makino, Y. Shimizu, M. Kanai, and M. Shibasaki, “Catalytic asymmetric synthesis of r207910,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, no. 23, pp. 7905–7907, 2010.
- [94] E. M. Svensson, S. Murray, M. O. Karlsson, and K. E. Dooley, “Rifampicin and rifapentine significantly reduce concentrations of bedaquiline, a new anti-tb drug,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 70, pp. 1106–1114, 12 2014.
- [95] J. Guillemont, C. Meyer, A. Poncelet, X. Bourdrez, and K. Andries, “Diarylquinolines, synthesis pathways and quantitative structure–activity relationship studies leading to the discovery of tmc207,” *Future Medicinal Chemistry*, vol. 3, no. 11, pp. 1345–1360, 2011.
- [96] H. A. Lardy, D. Johnson, and W. McMurray, “Antibiotics as tools for metabolic studies. i. a survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 78, no. 2, pp. 587–597, 1958.
- [97] J. Symersky, D. Osowski, D. E. Walters, and D. M. Mueller, “Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 35, pp. 13961–13965, 2012.
- [98] A. P. Srivastava, M. Luo, W. Zhou, J. Symersky, D. Bai, M. G. Chambers, J. D. Faraldo-Gómez, M. Liao, and D. M. Mueller, “High-resolution cryo-EM analysis of the yeast ATP synthase in a lipid membrane,” *Science*, vol. 360, no. 6389, p. eaas9699, 2018.
- [99] W. Zhou and J. D. Faraldo-Gómez, “Membrane plasticity facilitates recognition of the inhibitor oligomycin by the mitochondrial ATP synthase rotor,” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, vol. 1859, no. 9, pp. 789–796, 2018.
- [100] V. Leone and J. D. Faraldo-Gómez, “Structure and mechanism of the ATP synthase membrane motor inferred from quantitative integrative modeling,” *The Journal of General Physiology*, vol. 148, no. 6, pp. 441–457, 2016.
- [101] K. Hards, D. G. G. McMillan, L. A. Schurig-Briccio, R. B. Gennis, H. Lill, D. Bald, and G. M. Cook, “Ionophoric effects of the antitubercular drug bedaquiline,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 115, no. 28, pp. 7326–7331, 2018.
- [102] S. J. Grabowski, “What is the covalency of hydrogen bonding?,” *Chemical Reviews*, vol. 111, no. 4, pp. 2597–2625, 2011.
- [103] S. Scheiner, “The Hydrogen Bond: A Hundred Years and Counting,” *Journal of the Indian Institute of Science*, vol. 100, no. 1, pp. 61–76, 2020.

- [104] L. Pauling, *The Nature of the Chemical Bond—An Introduction to Modern Structural Chemistry*. New York: Cornell University Press, 1960.
- [105] S. J. Grabowski, “Theoretical studies of strong hydrogen bonds,” *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C: Phys. Chem.*, vol. 102, pp. 131–165, 2006.
- [106] S. J. Grabowski, “What is the covalency of hydrogen bonding?,” *Chemical Reviews*, vol. 111, no. 4, pp. 2597–2625, 2011.
- [107] S. Y. Sheu, D. Y. Yang, H. L. Selzle, and E. W. Schlag, “Energetics of hydrogen bonds in peptides,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 22, pp. 12683–12687, 2003.
- [108] D. Herschlag and M. M. Pinney, “Hydrogen bonds: Simple after all?,” *Biochemistry*, vol. 57, no. 24, pp. 3338–3352, 2018.
- [109] L. K. Saunders, H. Nowell, L. E. Hatcher, H. J. Shepherd, S. J. Teat, D. R. Allan, P. R. Raithby, and C. C. Wilson, “Exploring short strong hydrogen bonds engineered in organic acid molecular crystals for temperature dependent proton migration behaviour using single crystal synchrotron X-ray diffraction (SCSXRD),” *CrystEngComm*, vol. 21, no. 35, pp. 5249–5260, 2019.
- [110] S. Zhou and L. Wang, “Unraveling the structural and chemical features of biological short hydrogen bonds,” *Chemical Science*, vol. 10, no. 33, pp. 7734–7745, 2019.
- [111] S. J. Grabowski, *Hydrogen Bonding - New Insights*. Łódź: Springer, 2006.
- [112] I. Majerz and M. J. Gutmann, “Intermolecular ohn hydrogen bond with a proton moving in 3-methylpyridinium 2,6-dichloro-4-nitrophenolate,” *RSC Adv.*, vol. 5, pp. 95576–95584, 2015.
- [113] M. E. Tessensohn, M. Lee, H. Hirao, and R. D. Webster, “Measuring the relative hydrogen-bonding strengths of alcohols in aprotic organic solvents,” *ChemPhysChem*, vol. 16, no. 1, pp. 160–168, 2015.
- [114] P. A. Sigala, E. A. Ruben, C. W. Liu, P. M. B. Piccoli, E. G. Hohenstein, T. J. Martínez, A. J. Schultz, and D. Herschlag, “Determination of hydrogen bond structure in water versus aprotic environments to test the relationship between length and stability,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 137, no. 17, pp. 5730–5740, 2015.
- [115] W. W. Cleland and M. M. Kreevoy, “Low-barrier hydrogen bonds and enzymic catalysis,” *Science*, vol. 264, no. 5167, pp. 1887–1890, 1994.

- [116] C. L. Perrin, “Are short, low-barrier hydrogen bonds unusually strong?,” *Accounts of Chemical Research*, vol. 43, no. 12, pp. 1550–1557, 2010.
- [117] M. T. Kemp, E. M. Lewandowski, and Y. Chen, “Low barrier hydrogen bonds in protein structure and function,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, vol. 1869, no. 1, p. 140557, 2021.
- [118] H. Ishikita and K. Saito, “Proton transfer reactions and hydrogen-bond networks in protein environments,” *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 11, no. 91, p. 20130518, 2014.
- [119] P. A. Sigala, E. A. Ruben, C. W. Liu, P. M. B. Piccoli, E. G. Hohenstein, T. J. Martínez, A. J. Schultz, and D. Herschlag, “Determination of hydrogen bond structure in water versus aprotic environments to test the relationship between length and stability,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 137, no. 17, pp. 5730–5740, 2015.
- [120] D. Chen, N. Oezguen, P. Urvil, C. Ferguson, S. M. Dann, and T. C. Savidge, “Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing,” *Science Advances*, vol. 2, no. 3, p. e1501240, 2016.
- [121] R. Kurczab, P. Śliwa, K. Rataj, R. Kafel, and A. J. Bojarski, “Salt bridge in ligand–protein complexes—systematic theoretical and statistical investigations,” *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 58, no. 11, pp. 2224–2238, 2018.
- [122] Z. Jaworski and B. Zakrzewska, “Towards multiscale modelling in product engineering,” *Computers Chemical Engineering*, vol. 35, pp. 434–445, 03 2011.
- [123] D. Porezag, T. Frauenheim, T. Köhler, G. Seifert, and R. Kaschner, “Construction of tight-binding-like potentials on the basis of density-functional theory: Application to carbon,” *Phys. Rev. B*, vol. 51, pp. 12947–12957, May 1995.
- [124] G. Seifert, D. Porezag, and T. Frauenheim, “Calculations of molecules, clusters, and solids with a simplified lcao-dft-lda scheme,” *International Journal of Quantum Chemistry*, vol. 58, no. 2, pp. 185–192, 1996.
- [125] M. Elstner, D. Porezag, G. Jungnickel, J. Elsner, M. Haugk, T. Frauenheim, S. Suhai, and G. Seifert, “Self-consistent-charge density-functional tight-binding method for simulations of complex materials properties,” *Phys. Rev. B*, vol. 58, pp. 7260–7268, Sep 1998.
- [126] Y. Yang, H. Yu, D. York, Q. Cui, and M. Elstner, “Extension of the self-consistent-charge density-functional tight-binding method: third-order expansion of the density

- functional theory total energy and introduction of a modified effective coulomb interaction,” *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 111, no. 42, pp. 10861–10873, 2007.
- [127] M. Gaus, Q. Cui, and M. Elstner, “Dftb3: Extension of the self-consistent-charge density-functional tight-binding method (scc-dftb),” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 7, no. 4, pp. 931–948, 2011.
- [128] I. Newton, *Philosophiae Naturalis Principia Mathematica*. Prostat apud plures Bibliopolas, 1687.
- [129] L. Verlet, “Computer "experiments" on classical fluids. i. thermodynamical properties of lennard-jones molecules,” *Phys. Rev.*, vol. 159, pp. 98–103, Jul 1967.
- [130] J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, and H. J. C. Berendsen, “Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes,” *Journal of Computational Physics*, vol. 23, no. 3, pp. 327–341, 1977.
- [131] S. Miyamoto and P. A. Kollman, “Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 13, no. 8, pp. 952–962, 1992.
- [132] B. Hess, “P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 4, no. 1, pp. 116–122, 2008.
- [133] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak, “Molecular dynamics with coupling to an external bath,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 81, pp. 3684–3690, 10 1984.
- [134] H. C. Andersen, “Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 72, pp. 2384–2393, 02 1980.
- [135] M. Parrinello and A. Rahman, “Crystal structure and pair potentials: A molecular-dynamics study,” *Physical Review Letters*, vol. 45, pp. 1196–1199, 1980.
- [136] M. Parrinello and A. Rahman, “Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method,” *Journal of Applied Physics*, vol. 52, no. 12, pp. 7182–7190, 1981.
- [137] T. Darden, D. York, and L. Pedersen, “Particle mesh Ewald: An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 98, pp. 10089–10092, 06 1993.

- [138] G. Torrie and J. Valleau, “Nonphysical sampling distributions in monte carlo free-energy estimation: Umbrella sampling,” *Journal of Computational Physics*, vol. 23, no. 2, pp. 187–199, 1977.
- [139] J. Kästner, “Umbrella sampling,” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, vol. 1, pp. 932 – 942, 11 2011.
- [140] S. Kumar, J. M. Rosenberg, D. Bouzida, R. H. Swendsen, and P. A. Kollman, “The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. i. the method,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 13, no. 8, pp. 1011–1021, 1992.
- [141] C. Bartels, “Analyzing biased monte carlo and molecular dynamics simulations,” *Chemical Physics Letters*, vol. 331, no. 5, pp. 446–454, 2000.
- [142] A. Barducci, M. Bonomi, and M. Parrinello, “Metadynamics,” *WIREs Computational Molecular Science*, vol. 1, no. 5, pp. 826–843, 2011.
- [143] P. Tiwary and M. Parrinello, “A time-independent free energy estimator for metadynamics,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 119, no. 3, pp. 736–742, 2015.
- [144] A. Laio and F. L. Gervasio, “Metadynamics: a method to simulate rare events and reconstruct the free energy in biophysics, chemistry and material science,” *Reports on Progress in Physics*, vol. 71, p. 126601, nov 2008.
- [145] A. Barducci, G. Bussi, and M. Parrinello, “Well-tempered metadynamics: A smoothly converging and tunable free-energy method,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 100, p. 020603, Jan 2008.
- [146] E. L. Wu, X. Cheng, S. Jo, H. Rui, K. C. Song, E. M. Dávila-Contreras, Y. Qi, J. Lee, V. Monje-Galvan, R. M. Venable, J. B. Klauda, and W. Im, “Charmm-gui membrane builder toward realistic biological membrane simulations,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 35, no. 27, pp. 1997–2004, 2014.
- [147] E. Zinser, C. Sperka-Gottlieb, E.-V. Fasch, S. D. Kohlwein, F. Paltauf, and G. Daum, “Phospholipid Synthesis and Lipid Composition of Subcellular Membranes in the Unicellular Eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*,” *Journal of Bacteriology*, vol. 173, no. 6, pp. 2026–2034, 1991.
- [148] P. Mark and L. Nilsson, “Structure and dynamics of the tip3p, spc, and spc/e water models at 298 k,” *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 105, no. 43, pp. 9954–9960, 2001.

- [149] W. Zhou, F. Marinelli, C. Nief, and J. D. Faraldo-Gómez, “Atomistic simulations indicate the c-subunit ring of the F1Fo ATP synthase is not the mitochondrial permeability transition pore,” *eLife*, vol. 6, feb 2017.
- [150] S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer, and W. Im, “CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 29, no. 11, pp. 1859–1865, 2008.
- [151] 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. Brooks, A. D. MacKerell, J. B. Klauda, and 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*, vol. 12, pp. 405–413, Jan. 2016. Publisher: American Chemical Society.
- [152] E. L. Wu, X. Cheng, S. Jo, H. Rui, K. C. Song, E. M. Dávila-Contreras, Y. Qi, J. Lee, V. Monje-Galvan, R. M. Venable, J. B. Klauda, and W. Im, “CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 35, no. 27, pp. 1997–2004, 2014.
- [153] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, and A. D. Mackerell Jr., “CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 31, no. 4, pp. 671–690, 2010.
- [154] R. Bansal-Mutalik and H. Nikaido, “Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 13, pp. 4958–4963, 2014.
- [155] J. Słabońska, S. Sappati, A. Marciniak, and J. Czub, “Low-barrier hydrogen bond determines target-binding affinity and specificity of the antitubercular drug bedaquiline,” *ACS Medicinal Chemistry Letters*, vol. 15, no. 2, pp. 265–269, 2024.
- [156] J. Huang, S. Rauscher, G. Nawrocki, T. Ran, M. Feig, B. L. de Groot, H. Grubmüller, and A. D. MacKerell, “CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins,” *Nature Methods*, vol. 14, pp. 71–73, Jan. 2017.
- [157] R. Peverati and D. G. Truhlar, “Screened-exchange density functionals with broad accuracy for chemistry and solid-state physics,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 14, pp. 16187–16191, 2012.

- [158] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, “Gaussian 16,” 2016.
- [159] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, and H. J. C. Berendsen, “GROMACS: Fast, flexible, and free,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 26, pp. 1701–1718, Dec. 2005.
- [160] S. Nosé, “A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 81, pp. 511–519, July 1984.
- [161] M. Parrinello and A. Rahman, “Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method,” *Journal of Applied Physics*, vol. 52, pp. 7182–7190, Dec. 1981.
- [162] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L. G. Pedersen, “A smooth particle mesh Ewald method,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 103, pp. 8577–8593, Nov. 1995.
- [163] B. Hess, “P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 4, pp. 116–122, Jan. 2008.
- [164] C. Kutzner, J. Czub, and H. Grubmüller, “Keep It Flexible: Driving Macromolecular Rotary Motions in Atomistic Simulations with GROMACS,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 7, pp. 1381–1393, May 2011. Publisher: American Chemical Society.
- [165] M. R. Shirts and J. D. Chodera, “Statistically optimal analysis of samples from multiple equilibrium states,” *The Journal of chemical physics*, vol. 129, no. 12, p. 124105, 2008.

- [166] S. Kumar, J. M. Rosenberg, D. Bouzida, R. H. Swendsen, and P. A. Kollman, "Multidimensional free-energy calculations using the weighted histogram analysis method," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 16, no. 11, pp. 1339–1350, 1995.
- [167] M. Gaus, X. Lu, M. Elstner, and Q. Cui, "Parameterization of dftb3/3ob for sulfur and phosphorus for chemical and biological applications," *Journal of chemical theory and computation*, vol. 10, pp. 1518–1537, 04 2014.
- [168] S. Grimme, S. Ehrlich, and L. Goerigk, "Effect of the damping function in dispersion corrected density functional theory," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 32, no. 7, pp. 1456–1465, 2011.
- [169] T. Kubař, K. Welke, and G. Groenhof, "New qm/mm implementation of the dftb3 method in the gromacs package," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 36, no. 26, pp. 1978–1989, 2015.
- [170] G. Tribello, M. Bonomi, D. Branduardi, C. Camilloni, and G. Bussi, "Plumed 2: new feathers for an old bird," *Computer Physics Communications*, vol. 185, 10 2013.
- [171] P. H. König, M. Hoffmann, T. Frauenheim, and Q. Cui, "A critical evaluation of different qm/mm frontier treatments with scc-dftb as the qm method," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, no. 18, pp. 9082–9095, 2005.
- [172] M. C. Melo, R. C. Bernardi, T. Rudack, M. Scheurer, C. Riplinger, J. C. Phillips, J. D. Maia, G. B. Rocha, J. V. Ribeiro, J. E. Stone, F. Neese, K. Schulten, and Z. Luthey-Schulten, "NAMD goes quantum: An integrative suite for hybrid simulations," *Nature Methods*, vol. 15, no. 5, pp. 351–354, 2018.
- [173] J. C. Phillips, D. J. Hardy, J. D. C. Maia, J. E. Stone, J. V. Ribeiro, R. C. Bernardi, R. Buch, G. Fiorin, J. Hénin, W. Jiang, R. McGreevy, M. C. R. Melo, B. K. Radak, R. D. Skeel, A. Singharoy, Y. Wang, B. Roux, A. Aksimentiev, Z. Luthey-Schulten, L. V. Kalé, K. Schulten, C. Chipot, and E. Tajkhorshid, "Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 153, p. 044130, 07 2020.
- [174] F. Neese, "The ORCA program system," *WIREs Computational Molecular Science*, vol. 2, no. 1, pp. 73–78, 2012.
- [175] Y.-S. Lin, G.-D. Li, S.-P. Mao, and J.-D. Chai, "Long-range corrected hybrid density functionals with improved dispersion corrections," *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 9, no. 1, pp. 263–272, 2013.

- [176] S. Grimme, “Density functional theory with london dispersion corrections,” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, vol. 1, no. 2, pp. 211–228, 2011.
- [177] S. Kossmann and F. Neese, “Comparison of two efficient approximate Hartee–Fock approaches,” *Chemical Physics Letters*, vol. 481, no. 4, pp. 240–243, 2009.
- [178] C. Lee, W. Yang, and R. G. Parr, “Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density,” *Phys Rev B Condens Matter*, vol. 37, pp. 785–789, Jan. 1988.
- [179] J.-D. Chai and M. Head-Gordon, “Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom–atom dispersion corrections,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 10, pp. 6615–6620, 2008.
- [180] Y. Zhao and D. G. Truhlar, “The m06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four m06-class functionals and 12 other functionals,” *Theoretical Chemistry Accounts*, vol. 120, pp. 215–241, May 2008.
- [181] A. Kumar, S. D. Yeole, S. R. Gadre, R. López, J. F. Rico, G. Ramírez, I. Ema, and D. Zorrilla, “Damqt 2.1. 0: a new version of the damqt package enabled with the topographical analysis of electron density and electrostatic potential in molecules,” 2015.
- [182] N. Fischer, P. Neumann, A. Konevega, L. Bock, R. Ficner, M. Rodnina, and H. Stark, “Horizontal membrane-intrinsic alpha-helices in the stator a-subunit of an f-type atp synthase,” *Nature*, 01 2015.
- [183] J. Symersky, V. Pagadala, D. Osowski, A. Krah, T. Meier, J. Faraldo-Gómez, and D. Mueller, “Structure of the c10 ring of the yeast mitochondrial atp synthase in the open conformation,” *Nature structural molecular biology*, vol. 19, pp. 485–91, S1, 04 2012.
- [184] I. Mata, E. Molins, I. Alkorta, and E. Espinosa, “Topological properties of the electrostatic potential in weak and moderate n···h hydrogen bonds,” *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 111, no. 28, pp. 6425–6433, 2007.
- [185] L. Trevisan, A. D. Bond, and C. A. Hunter, “Quantitative measurement of cooperativity in h-bonded networks,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 144, no. 42, pp. 19499–19507, 2022.

- [186] S. Petrella, E. Cambau, A. Chauffour, K. Andries, V. Jarlier, and W. Sougakoff, “Genetic basis for natural and acquired resistance to the diarylquinoline r207910 in mycobacteria,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 50, no. 8, pp. 2853–2856, 2006.
- [187] J. P. Sarathy, P. Ragunathan, C. B. Cooper, A. M. Upton, and G. Grüber, “TBAJ-876 Displays Bedaquiline-Like Mycobactericidal Potency without Retaining the Parental Drug’s Uncoupler Activity,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, no. November 2019, pp. 8–13, 2020.
- [188] M. Luo, W. Zhou, H. Patel, A. P. Srivastava, J. Symersky, M. M. Bonar, J. D. Faraldo-Gómez, M. Liao, and D. M. Mueller, “Bedaquiline inhibits the yeast and human mitochondrial ATP synthases,” *Communications Biology*, vol. 3, no. 1, pp. 1–10, 2020.
- [189] A. R. Salomon, D. W. Voehringer, L. A. Herzenberg, and C. Khosla, “Apoptolidin, a selective cytotoxic agent, is an inhibitor of F_0F_1 -ATPase,” *Chemistry & Biology*, vol. 8, pp. 71–80, Jan 2001.
- [190] B. J. Murphy, N. Klusch, J. Langer, D. J. Mills, Özkan Yildiz, and W. Kühlbrandt, “Rotary substates of mitochondrial ATP synthase reveal the basis of flexible F1-Fo coupling,” *Science*, vol. 364, no. 6446, p. eaaw9128, 2019.

Dorobek naukowy

Publikacje naukowe

Marciniak, A., Chodnicki, P., Hossain, K., **Słabońska, J.**, & Czub, J. (2022). Determinants of Directionality and Efficiency of the ATP Synthase Fo Motor at Atomic Resolution. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 13, 387-392.

<https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.1c03358>

Hossain, K., Kogut, M., **Słabońska, J.**, Sappati, S., Wieczór, M., & Czub, J. (2023). How acidic amino acid residues facilitate DNA target site selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120.

<https://doi.org/10.1073/pnas.2212501120>

Słabońska, J., Sappati, S., Marciniak, A., & Czub, J. (2024). Low-Barrier Hydrogen Bond Determines Target-Binding Affinity and Specificity of the Antitubercular Drug Bedaquiline. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 15, 265-269.

<https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.3c00509>

Doniesienia konferencyjne

Biophysical Society 68th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, Stany Zjednoczone, 10-14.02.2024 *Significance of hydrogen bond in the mechanism of action of bedaquiline*

EBSA CONGRES 2023 Sztokholm, Szwecja, 31.07-4.08.2023, *Significance of hydrogen bond in the mechanism of action of bedaquiline*

Ions, Membrane and Channels: Multiscale simulations from quantum to coarse-grain. A symposium in honor of Michael L. Klein, FSR, Rzym, Włochy, 27-29.10.2022, *Significance of Hydrogen Bond in Bedaquiline bound to ATP synthase*

Hybrid Quantum Mechanics / Molecular Mechanics (QM/MM) Approaches to Biochemistry and Beyond, CECAM-HQ EPFL, Lozanna, Szwajcaria, 16-20.05.2022, *Molecular mechanism of ATP hydrolysis in the F1 ATP synthase protein*

2021 Bioexcel Summer School on Biomolecular Simulations, online, 4-11.06.2021, *the use of oligomycin as an inhibitor of ATP synthase*

Hünfeld 2021: Workshop on Computer Simulation and Theory of Macromolecules, online, 23-24.04.2021, *Mechanism of inhibition of ATP synthase*

International Young Scientists Conference 2021, Warszawa, 25-26.02.2021, *Mechanism of inhibition of ATP synthase by oligomycin and bedaquiline*

Dodatkowe staże i szkolenia

Drug Discovery for Ion Channels XXIV Symposium in Philadelphia, Pennsylvania, Stany Zjednoczone, 9.02.2024

Research Internship, Institute of Physical Chemistry, Karlsruhe Institute of Technology, Marcus Elstner group, Karlsruhe, Niemcy, 20-24.06.2022

Daresbury DFTB+ School, CECAM-UK-DARESBUR, Daresbury, Wielka Brytania, 6-10.06.2022