

Tojásfehérje lizozim és szén nanocső kölsönhatásának modellezése molekuladinamikai szimulációs módszerekkel

TDK-dolgozat

Szerző:

Zeöld Blanka

Témavezető:

Dr. Szabó Tibor
egyetemi adjunktus
Dr. Tarjányi Tamás
egyetemi tanársegéd



Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet
SZTE SZAOK, TTIK

Szeged

2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	2
1 Bevezetés.....	3
2 Anyagok és módszerek.....	5
2.1 Lizozim fehérje.....	5
2.2 Szén nanocső.....	5
2.3 Molekuladinamikai szimulációs módszerek.....	6
2.4 MD erőkterek és topológia.....	8
2.5 Időfejlesztő algoritmusok.....	8
2.6 Barosztát és termosztát.....	9
3 Célkitűzések	11
4 Eredmények és diszkusszió.....	12
4.1 A rendszer elkészítése és jellemzése	12
4.2 Egyensúlyi állapot	13
4.3 Szimuláció eredményei	18
5 Összefoglalás.....	23
6 Köszönetnyilvánítás	25
7 Saját eredmények	26
8 Irodalomjegyzék.....	27

Rövidítések jegyzéke

AFM – Atomierő-mikroszkóp (Atomic Force Microscope)

CNT – Szén nanocső (Carbon nanotube)

EM – Energia-minimalizáció (Energy minimization)

FF – Erőtér (Force Field)

GROMACS – Molekuladinamikai szoftvercsomag, korábban a GRONingen MACHine for Chemical Simulations rövidítése

MD – Molekuladinamikai (Molecular dynamics)

PT– Izoterm-izobár sokaság (constant Number of particles, Pressure, and Temperature)

NVT – Izoterm-izochor sokaság (constant Number of particles, Volume, and Temperature)

PDB – Protein Data Bank

R_g – Girációs sugár (Radius of gyration)

RMSD – Átlagtól való négyzetes eltérésnek a négyzetgyöke (Root-Mean-Square Deviation)

SWNT – Egyfalú szén nanocső (Single-walled nanotube)

TIP3P – (Transferable Intermolecular Potential 3-Point)

VMD – Visual Molecular Dynamics, molekuladinamikai trajektória megjelenítő szoftver

Jelölések: **Vektor** (félkövér), *skalár* (dőlt)

1 Bevezetés

1.1 Áttekintés

Napjainkra a számítási teljesítmény lehetővé tette, hogy fehérjék és egyéb szerkezetek kölcsönhatását modellezzük és szimuláljuk atomi szinten. A molekuladinamikai (MD) szimulációk a részecskék rendszerének mozgását szimuláló tudomány¹. A MD szimulációkat a fehérjefunkció, a fehérje stabilitás, a fehérje-fehérje kölcsönhatás, az enzimatis reakciók és a gyógyszer-fehérje kölcsönhatások, valamint a membránfehérjék tanulmányozására is használják². Ezek a szimulációk a fehérjék és más biomolekulák viselkedését teljes atomi részletességgel és nagyon finom időbeli felbontással rögzítik³.

A MD módszerek a klasszikus newtoni mechanika segítségével vizsgálja a rendszerek dinamikáját. A dinamika számítása során különböző szemiempirikus potenciálokat használhatunk, amelyek részben az *ab initio* kvantumkémiai számításokra támaszkodnak, valamint további illesztési eljárásokat és finomhangolást végeznek rajtuk, hogy megbízhatóan illeszkedjenek a kísérleti megfigyelésekhez. Dolgozatomban a már alaposan tanulmányozott tojásfehérje lizozim (1Aki) kölcsönhatását vizsgáltuk szén nanocső szerkezettel (CNT) MD módszerrel. Az 1Aki lizozim egy enzim, amely a baktérium sejtfa peptidoglikán rétegét bontja és fontos szerepe van az antibakteriális védelemben. Az ehhez hasonló lizozim enzimek számos élőlényben is megtalálhatók^{4, 5}. A tojásfehérjében található 1Aki lizozim különösen jól ismert és sokat kutatott fehérje. Szerkezete egyszerű és könnyen hozzáférhető az adatbázisokban⁶, így gyakran használják modellfehérjeként MD szimulációkhoz⁷.

A CNT hengeres nanostruktúra, amelyek hatszögletű rácsban elhelyezkedő szénatomokból áll. Kivételes mechanikai szilárdságot, elektromos vezetőképességet és hőstabilitást mutatnak. Ezek a tulajdonságok rendkívül értékesé teszik a CNT-ket különböző alkalmazásokban, beleértve a MD szimulációkat is. Ezekben a szimulációkban modellként használják őket a nanoméretű kölcsönhatások és anyagi viselkedés vizsgálatához⁸.

1.2 Előzmények

A Szegedi Biofizikai Kutatócsoport korábban kísérleti módszerekkel vizsgálta fehérjék és szén nanocső szerkezetek kölcsönhatását. Ennek során fotoszintetikus reakciócentrum-fehérjét kapcsoltak elektródfelülethez szén nanocső segítségével. A kialakított felületen található

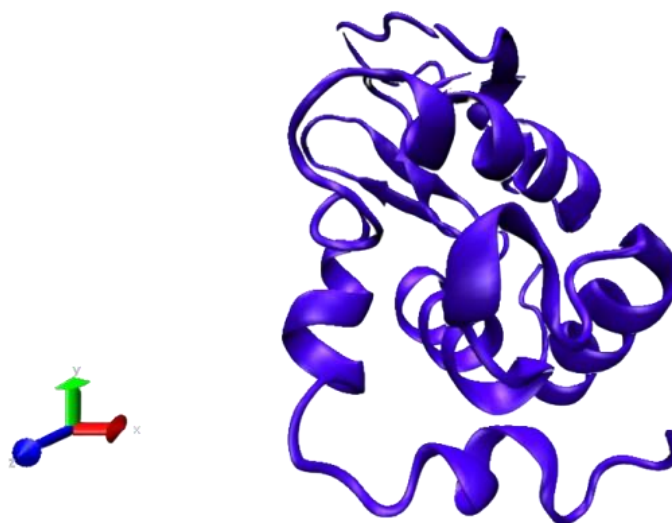
fotoszintetikus fehérjék fény hatására áramot generálnak. Ezzel olyan stabil hibrid rendszerek hozhatók létre, amelyek képesek detektálni herbicideket és más inhibitorokat.

A kísérleti tapasztalatok alapján a fehérje és nanocső relatív konformációja nagyban befolyásolja az elektrontranszfert, ugyanis a fehérje jól definiált donor és akceptor hellyel is rendelkezik. A cikkben említett elrendezésben azonban a konformáció nem ismert. A preferált konformációk feltérképezésére megoldást adhat a MD szimulációk⁹.

2 Anyagok és módszerek

2.1 Lizozim fehérje

A fentebb megismert 1Aki lizozim egy kis enzim, amely 129 aminosavból áll, molekulatömege 14,3 kDa, egyedülálló hidrofób magjáról és hidrofil felületéről is ismert. Szerkezetileg a lizozim két doménből áll, az úgynevezett alfa-domén és béta-domén. Ezeket egy α -hélix köt össze, és az aktív hely e domének között helyezkedik el, ami kulcsfontosságú antibakteriális hatása szempontjából¹⁰. A szerkezeti felépítését az 1. ábra mutatja be.

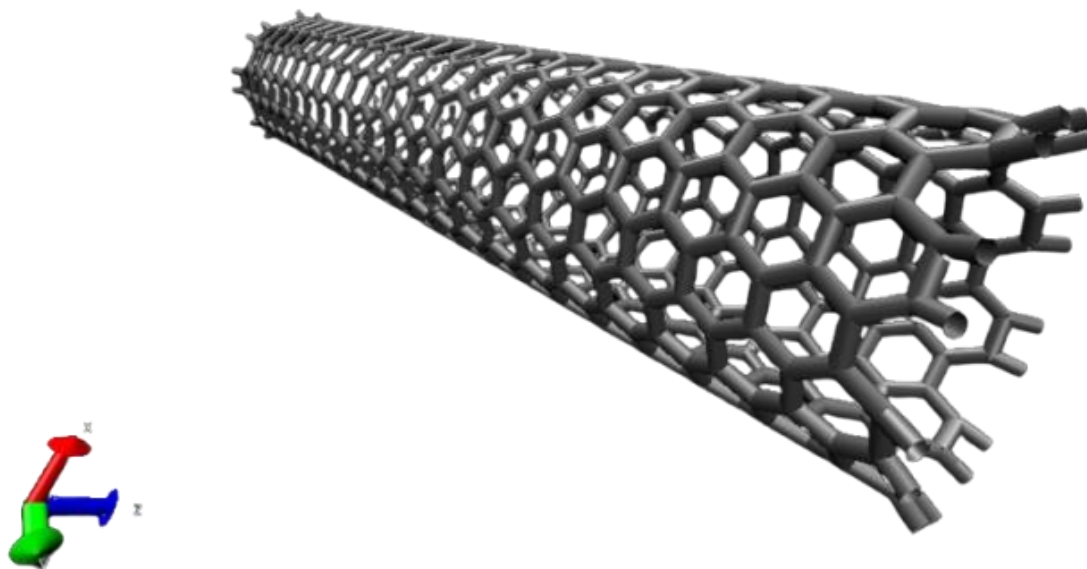


1. ábra: Tojásfehérje lizozim (1Aki). A képet a VMD 1.9.4 szoftverrel készítettem.

2.2 Szén nanocső

A bevezetőben említett CNT-t először Sumio Iijima japán fizikus figyelte meg 1991-ben^{11,12}. Jellemzően néhány nanométer átmérőjűek, valamint nagy a hosszúság/átmérő arányuk¹³. A 2. ábra egy általam készített CNT modellt szemléltet. A szén nanocsövek egyszerű kémiai összetétellel és atomi kötési konfigurációval rendelkeznek, de talán a legszélsőségesebb sokféleséget mutatják a nanoanyagok között a szerkezetek és a szerkezet-tulajdonságok körében. Az (m,n) indexek határozzák meg az átmérőt és a kiralitást, amelyek a nanocső kulcsparaméterei.

A kiralitástól (a hatszögek és a cső tengelye közötti királis szög) függően az egyfalú CNT (SWNT) rendelkezhet vezető vagy félvezető tulajdonságokkal. Azonos kiralitású félvezető nanocsövek esetében a tiltott sáv szélesség fordítottan arányos az átmérővel¹⁴. Ilyen esetben viszonylag nagy tiltott sávval rendelkeznek, ami egy tipikus 1,5 nm átmérő esetén $\sim 0,5$ eV. Növelve a szén nanocső átmérőt a tiltott sáv akár lecsökkenhet ~ 10 meV-ra is. A CNT-k rendelkeznek az egyik legmagasabb szobahőmérsékletű hővezető képességgel az ismert anyagok közül, amely akár eléri a $3000 \frac{\text{W}}{\text{mK}}$ értéket is¹⁵.



2. ábra: Szén nanocső (CNT). A képet a VMD 1.9.4 szoftverrel készítettem.

2.3 Molekuladinamikai szimulációs módszerek

A MD szimulációs számítások rendkívül hasznossá váltak az elmúlt évtizedekben. A módszerrel viszonylag nagy atomszámú rendszereket is lehet szimulálni¹⁶. A Born-Oppenheimer-közelítés értelmében az elektronok mozgása sokkal gyorsabb az atommagokénál, mivel az atommagok jóval nehezebbek. Ennek köszönhetően a molekulát klasszikus rendszerként modellezhetjük, ahol az atommagok töltéssel rendelkező, rugókkal összekötött tömegpontokként viselkednek. A Schrödinger-egyenlet megoldása helyett az atommagok pozíciójától függő $E(\mathbf{r})$ potenciálfüggvényt egy empirikus vagy szemiempirikus potenciálfüggvénnyel helyettesíthetjük.

A MD számításokban az időfejlesztő algoritmus egy adott részecske (atom) viselkedését leíró potenciált (V) vizsgál, majd kiszámítja a részecskék közötti potenciál negatív gradiensét. Ezen mennyiség a részecskére ható $\mathbf{F}$ erővel egyenlő, amelyet az 1. egyenlet ír le:

$$\mathbf{F} = -\nabla V(\mathbf{r}), \quad (1)$$

ahol ∇ a Nabla operátor, mely a parciális deriválást jelöli a különböző irányokba. A $V(\mathbf{r})$ a korábban említett potenciálfüggvény, ami függ a helytől.

A részecske gyorsulásának számításához Newton második törvényét használhatjuk (2. egyenlet):

$$\mathbf{F} = m\mathbf{a}, \quad (2)$$

ahol m a részecske tömege és $\mathbf{a}$ a gyorsulása.

A gyorsulás az időegységenként változó sebességet írja le (3. egyenlet), aminek segítségével az atom pozíciójának változását követhetjük (4. egyenlet).

$$\mathbf{a} = \frac{d\mathbf{v}}{dt}, \quad (3)$$

$$\mathbf{v} = \frac{d\mathbf{r}}{dt}. \quad (4)$$

Ezen egyenleteket felhasználva felírható az 5. egyenlet, amely tehát az atommagok mozgását írja le. Sokrészecske-rendszerek esetén a megoldását numerikusan tudjuk közelíteni. A végső formát a 6. egyenlet írja le¹⁷.

$$-\nabla V = m \left(\frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} \right), \quad (5)$$

$$-\frac{dE}{d\mathbf{r}} = m \left(\frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} \right) \quad (6)$$

A molekuladinamikai számítások elvégzéséhez több programcsomag is elérhető, többek között a CHARMM¹⁸ vagy a GROMACS¹⁹.

2.4 MD erőkterek és topológia

A MD szimulációk során a rendszerben lévő atomok között fellépő kölcsönhatásokat potenciálfüggvények segítségével írják le. Az erőtér ezen függvények együttese²⁰. A paramétereket jellemzően *ab initio*, vagy félig empirikus kvantummechanikai számításokból, valamint kísérleti adatokhoz való illesztéssel nyerik, mint a neutron-, röntgen- és elektrondiffrakció, NMR, infravörös, Raman- és neutronspektroszkópia stb. Az erőtér (FF) a valódi potenciált egy, a szimulált régióban érvényes egyszerűsített modellel helyettesíti. Ideális esetben elég egyszerűnek kell lennie ahhoz, hogy gyorsan kiértékelhető legyen, de kellően részletes ahhoz, hogy reprodukálja a vizsgált rendszer tulajdonságait. A szakirodalomban számos erőtér áll rendelkezésre, amelyek különböző bonyolultságúak és különböző típusú rendszerek kezelésére irányulnak²¹.

Többféle potenciál paraméter csomag van, az egyik legelterjedtebb a GROMOS²². A csomagok tartalmazzák az egyes atomok potenciál paramétereit, melyek függenek az atomok térbeli elrendezésétől és a kötések geometriai kényszereitől is¹⁶.

2.5 Időfejlesztő algoritmusok

Az 5. mozgásegyenletek integrálása számos numerikus közelítéssel történhet. Az integrációs algoritmusok közül a legismertebbek és széleskörben használt bakugrás (Leapfrog) és Verlet algoritmus²³.

A bakugrás módszer az MD számításoknál gyakran alkalmazott algoritmus. Az aktuális pillanatbeli pozíció alapján számított erőből, valamint a fél időlépés távolságból számított sebességgel határozza meg a részecske új koordinátáit. A sebesség így mindig fél lépésenként, míg a koordináta teljes lépésenként kerül frissítésre (7. és 8. egyenlet):

$$\mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m}\mathbf{F}(t), \quad (7)$$

ahol az erő a fentebb tárgyalt 1. egyenlet alapján kerül számításra. Az új koordináta egyenletét felírhatjuk a következőképpen (8. egyenlet):

$$\begin{aligned} \mathbf{r}(t + \Delta t) &= \mathbf{r}(t) + \Delta t * \left[\mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m}\mathbf{F}(t) \right] = \\ &= 2\mathbf{r}(t) + \mathbf{r}(t - \Delta t) + \frac{\Delta t^2}{m}\mathbf{F}(t) + \mathcal{O}(\Delta t^4) \end{aligned} \quad (8)$$

A formula Δt -ben harmad rendig ad pontos közelítést, a $\mathcal{O}(\Delta t^4)$ járulék került elhanyagolásra¹⁶.

A Verlet (Velocity Verlet) algoritmus lényege hasonlít a bakugráséhoz (9, 10. egyenlet)²⁴.

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \Delta t \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 \mathbf{a}(t) + \mathcal{O}(\Delta t^3), \quad (9)$$

$$\mathbf{v}(t + \Delta t) = \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \Delta t [\mathbf{a}(t) + \mathbf{a}(t + \Delta t)] + \mathcal{O}(\Delta t^3). \quad (10)$$

A különbség annyi a módszerek között, hogy az időlépések egészszámú többszöröseinél lesz meghatározva mind a koordináta ($\mathbf{r}$), mind a sebesség ($\mathbf{v}$). Ha ügyelünk a megfelelő kezdeti feltételekre, akkor a felvázolt két algoritmus azonos trajektoriákat, azaz részecskék időbeli mozgását tartalmazó adattömböt hoznak létre.

2.6 Barosztát és termosztát

A Berendsen termosztát/barosztát az egyik legegyszerűbb módszer, melynek használata éppen ezért éles szimulációknál nem ajánlott. Ettől függetlenül később lesz rá szükség, így a bemutatását megtartom. A Berendsen termosztátnál a szimulált hőmérséklet eltérése a célhőmérséklettől exponenciálisan csökken, azaz a rendszer hőmérsékleteltérése (T) egyre jobban közelít a referencia hőmérsékletéhez (T_0). A rendszer ebben az esetben folyamatos kapcsolatban van, csatolva van a hőtartályhoz. A 11. egyenlet mutatja be a Berendsen termosztát-csatolási módszert:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau}, \quad (11)$$

ahol τ egy időkonstans, melynek tipikus értéke $\sim 0,1$ ps^{16, 25}. Az egyes atomok sebességét pedig ennek segítségével skálázza, hasonlóan a rescale módszerhez.

A Berendsen barosztát (12. egyenlet) hasonlóan épül fel az azonos nevű termosztáthoz:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_P}, \quad (12)$$

ahol P a nyomás szerepel a hőmérséklet helyett, P_0 a referencianyomás, és a τ_P a nyomás-csatolási időállandó^{16, 25}. Hátránya, hogy nem képes a kanonikus sokaságot megfelelően modellezni. Ugyanakkor gyorsasága miatt hasznos lehet vele beállítani a kezdeti hőmérsékletet és nyomást az éles MD szimulációkhoz²⁶.

Napjainkban a Nosé-Hoover termosztátot használják az egyik leggyakrabban az MD szimulációkhoz. Ezen megközelítés során a rendszer szintén egy hőtartályhoz van csatolva, amelynek az effektívtömege Q , s koordinátája és $Q\dot{s}$ az impulzusa²⁶. Ez a kiterjesztett módszer úgy szabályozza a hőmérsékletet, hogy egy termikus tartályt és egy nem-newtoni súrlódási tagot visz be a mozgásegyenletbe (13. és 14. egyenlet):

$$\frac{d^2 r_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i} - \frac{p_\xi}{Q} \frac{dr_i}{dt}, \quad (13)$$

$$\frac{dp_\xi}{dt} = (T - T_0), \quad (14)$$

ahol p_ξ a ξ (súrlódási paraméter) impulzusa²⁵.

3 Célkitűzések

Kutatócsoportunk már korábban foglalkozott szén nanocsövek és fehérjék kölcsönhatásával. Kísérleti módszerekkel vizsgáltuk, hogy a fehérje konformációja mekkora mértékben van hatással a kötődésekre. A MD szimulációk alkalmasak a további konformációs lehetőségek feltárására.

Kutatásom során a következő célokat határoztuk meg:

1. **A tojásfehérje lizozim és a szén nanocsövek közötti kölcsönhatás vizsgálata.** A dolgozat fő célja, a tojásfehérje lizozim (1Aki) kapcsolatának vizsgálata egy szén nanocső modellel. A MD modellezési módszerek lehetőséget adnak a kölcsönhatások molekuláris szintű vizsgálatára, ami különösen fontos a fehérjék szerkezeti stabilitásának és konformációs változásainak megértéséhez.
2. **A fehérjék szerkezeti stabilitásának és dinamikájának elemzése.** Szimulációkkal vizsgálható, hogy a lizozim fehérje megőrzi-e kompakt, feltekeredett állapotát szén nanocsövek jelenlétében. A CNT-re való kitapadás időbeli stabilitását jellemezni lehet a köztük lévő távolsággal az idő függvényében, ennek meghatározása szintén célom.
3. **Aminosavak és kölcsönhatásaik azonosítása.** Szintén a kutatás célja a fehérje és a nanocső közötti kölcsönhatás szempontjából különösen fontos aminosavak meghatározása. A szimulációk segítségével felfedezhető, hogy mely aminosavak játszanak domináns szerepet a kötődésben, és ezek a kapcsolódások hogyan befolyásolják a fehérje szerkezetét.

4 Eredmények és diszkusszió

4.1 A rendszer elkészítése és jellemzése

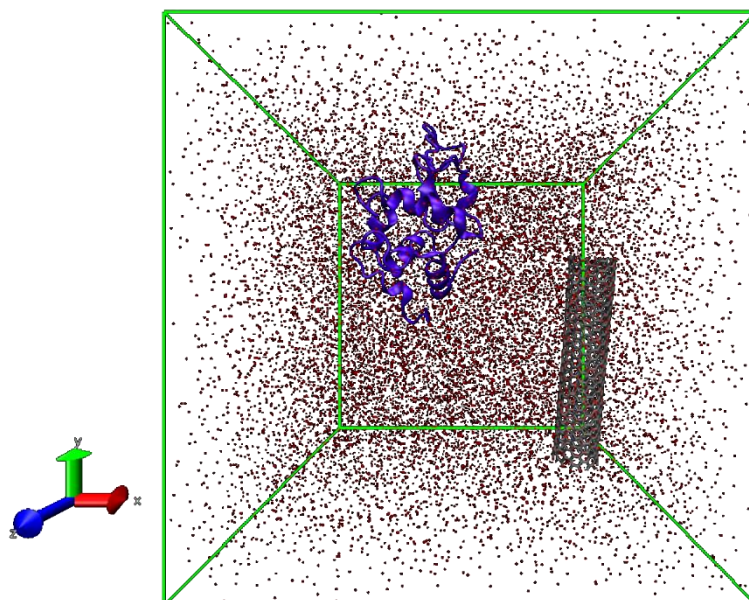
A számításainkhoz a már fentebb említett GROMACS¹⁹ szoftvercsomagot használtuk, amit egy Ubuntu²⁷ rendszeren keresztül tudtunk futtatni. Az Ubuntu egy modern operációs rendszer, amely egy nyílt forráskódú Linux²⁷. A nagyobb számításokat a Komondor szuperszámítógép GPU partícióján végeztük²⁸, ugyanis hatalmas teljesítménye nagyságrendekkel lerövidítette a számoláshoz szükséges időt.

A rendszer összeállításához Justin A. Lemkul oktatóanyagát vettük alapul²⁹. Első lépésként letöltöttük a fehérje szerkezeti felépítését tartalmazó fájlt, a Protein Data Bank (PDB) oldaláról, amely ingyenesen elérhető pdb formátumban⁶. Ennek köszönhetően el tudtuk kezdeni a legfontosabb fájlok létrehozását: a topológia-, a pozíciókra vonatkozó kényszert tartalmazó fájlt és a feldolgozott szerkezeti fájlt. Az utóbbi tartalmazza az átalakított struktúrát. A kényszert leíró fájl a fehérje gerincére ír elő egy extra potenciált, így azon atomok mozgása korlátozott a szimuláció közben. A fehérjék vagy szén nanocsövek alapból korlátlanul mozoghatnak a megadott térben, de a korlátozásnak köszönhetően le lehet fixálni bizonyos atomok pozícióját a kezdeti szimulációkhoz, amelyre az egyensúlyiállapotok keresése során sor kerül. Végül a topológia fájl egyesíti az előbb említett fájlokat, az erőter csomaggal.

Az erőter fájljait (CHARMM36-os¹⁸), a MacKerell lab³⁰ weboldalról töltöttük le. Az FF mellett még felhasználtuk a TIP3P (Transferable Intermolecular Potential 3-Point) vízmodellt³¹, és az -NH₃ (Amino csoport), valamint -COOH (Karboxil csoport) funkciócsoportokat is a fehérjéhez tartozó topológia fájlok létrehozásához. A TIP3P modell a vizet három pontból álló, merev molekulaként kezeli^{16, 32}, amelynek a legújabb verziója fehérjékre lett optimalizálva³³.

Ezt a folyamatot elvégeztük mind az 1Aki fehérjére és a szén nanocsőre³⁴. Az 5 nm-es szén nanocső szerkezetét a VMD szoftverrel³⁵ hoztuk létre, és mentettük el külön fájlként. A legfontosabb része a feladatnak a két molekula egy rendszerbe helyezése volt. Ezt egy erre a feladatra kifejlesztett paranccsal³⁶ értük el, aminek köszönhetően egy 20*20*20 nanométeres rendszerben (dobozban) szabadon tudtak mozogni. A következő lépésben a dobozt feltöltöttük vízmolekulákkal és hozzáadtuk az ionokat, hogy egy töltéssemleges rendszert kapjunk.

A 3. ábrán ezt a rendszert mutatom be, figyelve arra, hogy csak minden ötödik vízmolekula jelenjen meg a láthatóság érdekében. Az ionok száma elhanyagolható a vízmolekulák számához képest, így azok nem látszódnak a képen.



3. ábra: Az 1Aki fehérje és a szén nanocső a vízzel telített dobozban. Színelölés: Fehérje: lila, Nanocső: szürke, Víz: piros, Doboz: zöld. A képet a VMD 1.9.4 szoftverrel készítettem.

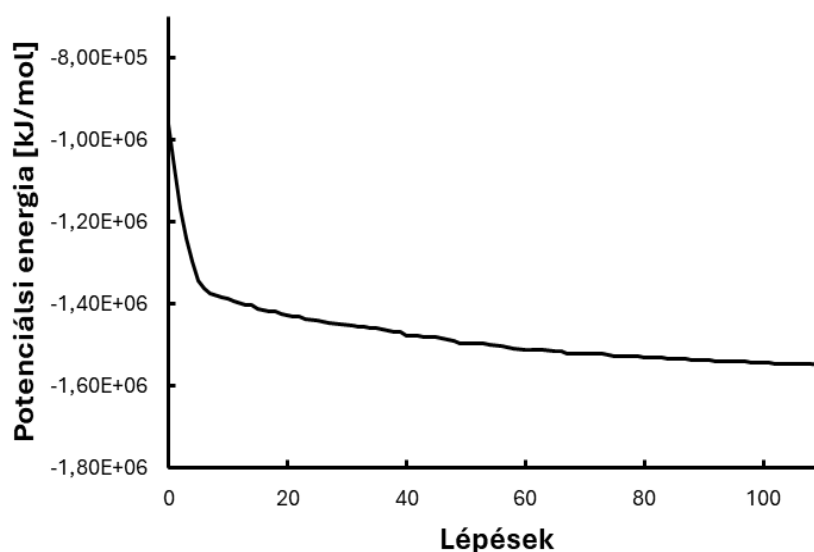
4.2 Egyensúlyi állapot

A rendszer először egy energia-minimalizáció eljáráson esett át. Mielőtt elkezdhetnénk a dinamikát, meg kell győződnünk arról, hogy a rendszerben nincsenek szterikus ütközések vagy nem megfelelő geometria. Gyakran előfordulnak olyan helyzetek, amikor akár a fehérjéhez, akár a szén nanocsőhöz olyan közel kerülnek vízmolekulák, amik fizikailag nem lennének valóságok. Az ilyen és ehhez hasonló állapotok kiküszöbölésére használjuk az energia-minimalizációt, ahol az iterációs lépések során potenciálokat és azok gradiensét határozza meg egy algoritmus. A módszer fokozatosan módosítja az atomok pozícióját a kezdeti állapotból eredő magas potenciálok és erők csökkentése érdekében. Mivel az energia-minimalizációs folyamat nem időben zajlik, az elvégzett lépések száma mutatja meg mennyi módosításra volt szükség a stabil állapot eléréséhez. A folyamat lényege abban rejlik, hogy megállapíthassuk, hogy a rendszer potenciális energiája felvette-e egy minimum értékét. Sokszor el sem indul a

Eredmények és diszkusszió

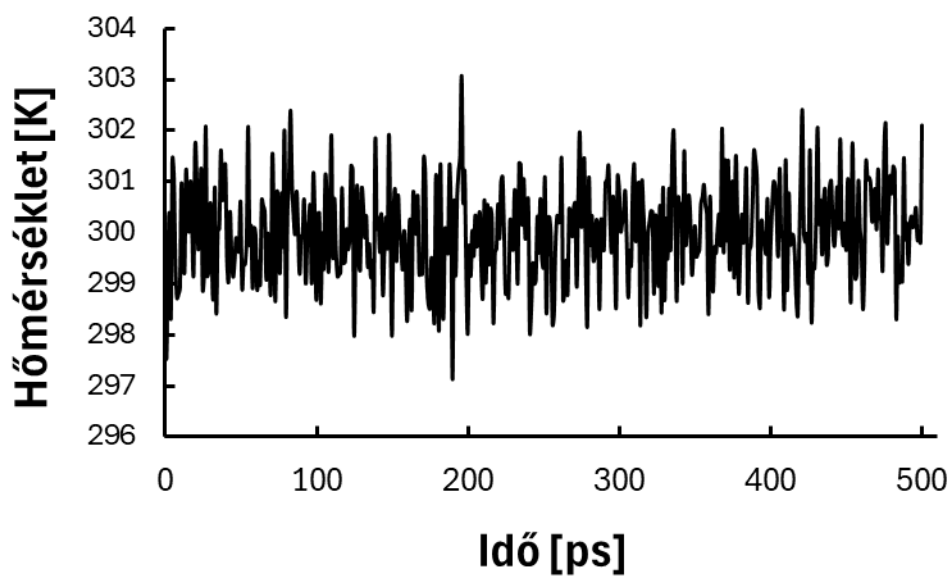
szimuláció, ha ezek a magas értékek nem csökkennek le egy kívánt érték alá, mert „felrobban” a Newton egyenlet.

A teljes folyamat akkor ér véget, ha egy előre meghatározott kritikus érték alá csökken a fellépő erő ($1000 \frac{\text{kJ}}{\text{mol nm}}$), vagy ha elérjük az előre megadott maximum lépésszámot (pl.: 50 000 lépés). A 4. ábrán látszik, hogy az általunk készített rendszer 110 lépést követően már közelíti a minimumot, ami egy gyors konvergálást jelent.

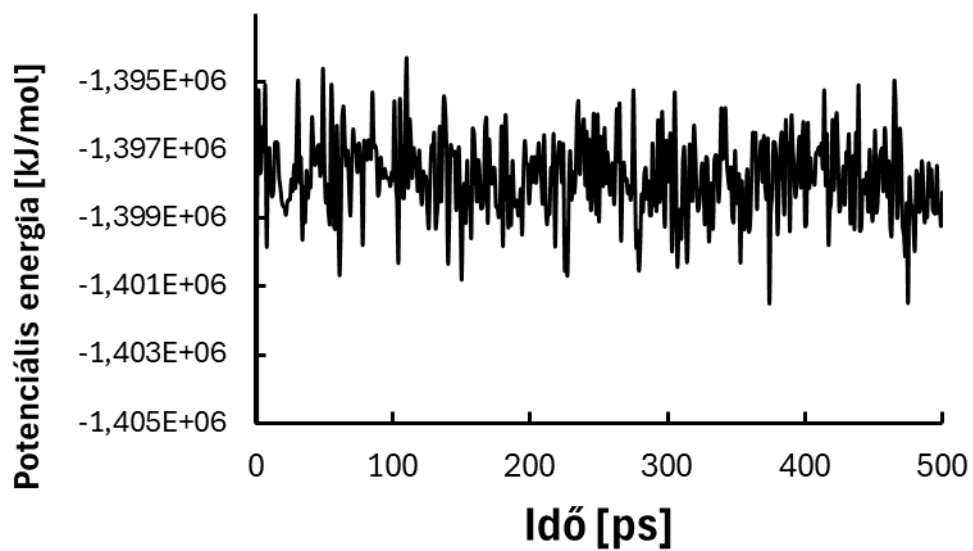


4. ábra: Energia-minimalizációs folyamat, ahol a rendszer teljes potenciális energiája (kJ/mol) van ábrázolva az iterációs lépések függvényében. A diagramot a Microsoft Excel programmal készítettem.

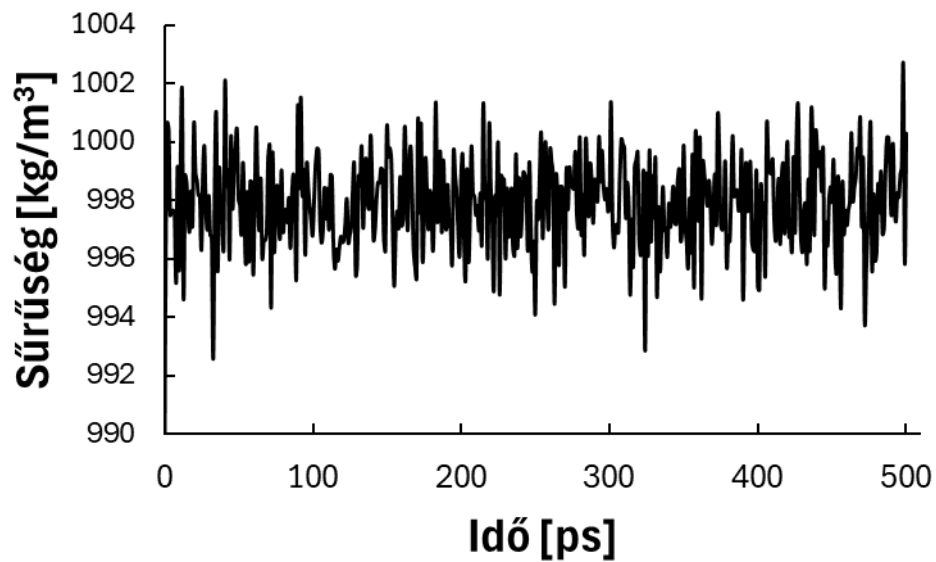
A következő lépés az egyensúlyi állapot létrehozása, mely szokásosan legalább két részből áll: NVT (izoterm-izochor sokaság) és NPT (izoterm-izobár sokaság) részekből. Az NVT során állandó a részecskék száma, a térfogata és a hőmérséklete a rendszernek. Az NPT annyiban különbözik, hogy a térfogat helyett a nyomása konstans. Az NVT és NPT folyamatot is 250 000 lépésben 500 ps alatt futtattuk le, 2 fs időlépésközzel, amit az 5. és 6. ábra (NVT), valamint 7. és 8. ábra (NPT) mutat be. Az NVT során V-rescale termosztátot alkalmaztunk, ami egy sebesség skálázó módszer. Az NPT futása alatt a V-rescale termosztát mellett a Parinello-Rahman barosztátot használtuk.



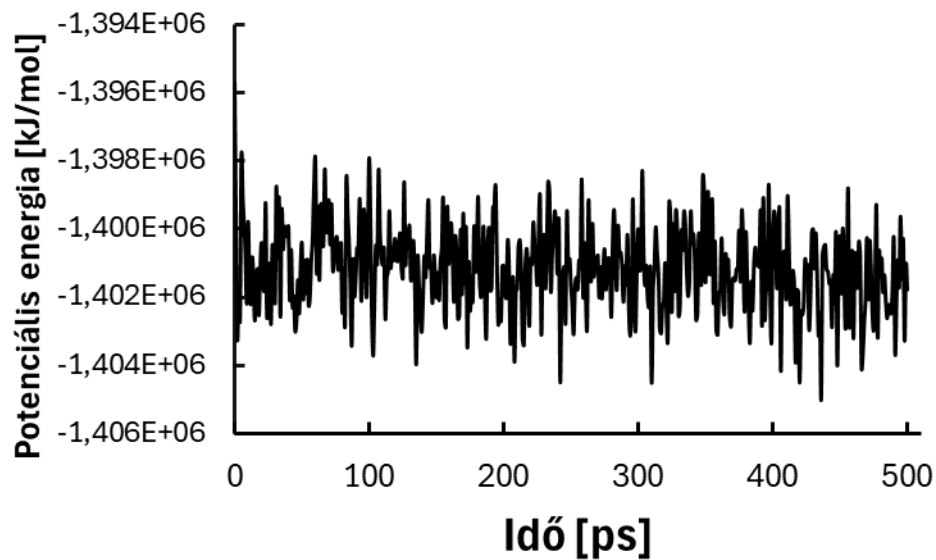
5. ábra: NVT futtatás során a hőmérséklet (K) az idő (ps) függvényében. A diagramot a Microsoft Excel programmal készítettem.



6. ábra: NVT futtatás során a potenciális energia (kJ/mol) az idő (ps) függvényében. A diagramot a Microsoft Excel programmal készítettem.



7. ábra: NPT futtatás során a sűrűség (kg/m^3) az idő (ps) függvényében. A diagramot a Microsoft Excel programmal készítettem.



8. ábra: NPT futtatás során a rendszer teljes potenciális energiája (kJ/mol) az idő (ps) függvényében. A diagramot a Microsoft Excel programmal készítettem.

Eredmények és diszkusszió

Az 5., 6., 7., 8. ábra alapján megállapítható, hogy a vizsgált mennyiségek stabilan oszcillálnak egy állandó érték körül. Az NVT folyamat alatt a hőmérséklet 300 K közelében marad, míg a potenciál $-1,40 \cdot 10^6 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ körül mozog. Az NPT során a sűrűség a víz sűrűsége ($997 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$) körül oszcillált, míg a potenciál ugyanazt az átlagot hozta, mint az előző folyamat során ($\sim -1,40 \cdot 10^6 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$). Ezen adatok alapján megállapíthatjuk, hogy az egyensúlyi állapotkeresések megfelelőnek bizonyultak.

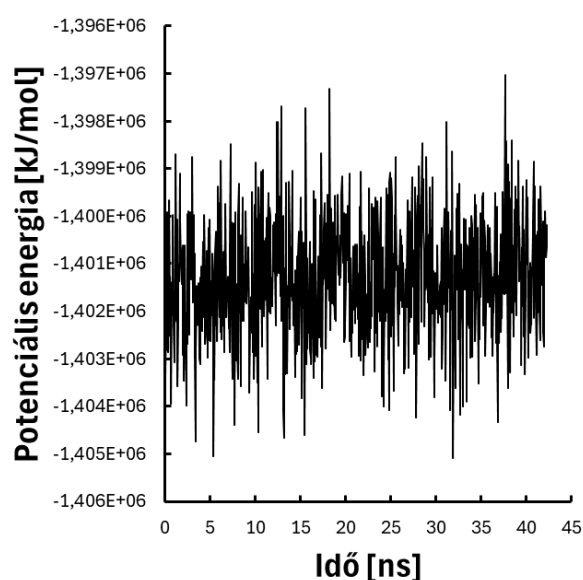
Ezek után feloldhatjuk a pozíciókorlátozásokat és elindíthatjuk az éles MD futtatását. A tényleges szimulációt egy 1 ns hosszú MD szimuláció előzte meg Berendsen barosztáttal és Nosé-Hoover termosztáttal (továbbiakban előszimuláció), ahol tovább finomítottuk az egyensúlyi állapotot, és a hosszabb szimuláció, kiértékelés innen indult. Az éles szimuláció szintén Nosé-Hoover termosztáttal futott le, a modern C-rescale barosztáttal 45 ns alatt, ami 5 óra számolást igényelt a komondor szuperszámítógépen.

Párhuzamosan ezzel beküldésre került egy 250 ns-os szimuláció is a komondor szuperszámítógépre, amely a dolgozat beadásáig nem futott le.

4.3 Szimuláció eredményei

A módszerek fejezetben leírt szimulációk 5 órán át futottak a komondor szuperszámítógépen, ennek eredményeit itt fejtem ki.

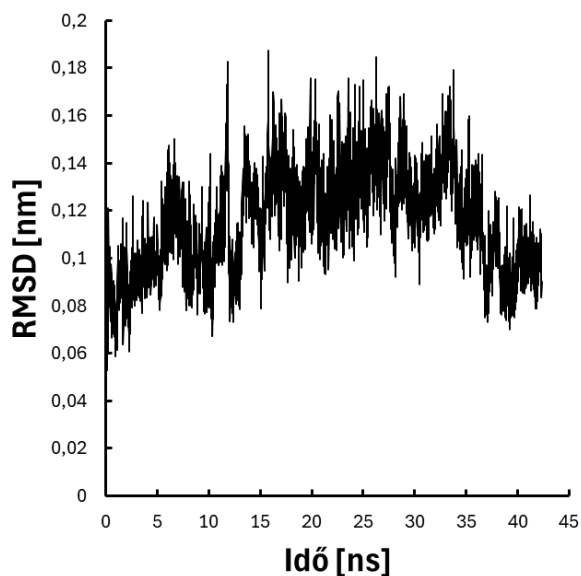
A teljes rendszer potenciális energiája beállt egy szintre és csak kis mértékű oszcilláció figyelhető meg. A rendszer teljes potenciális energiájában az energia-minimalizáció során kapott értékhez képest csekély mértékű eltérés tapasztalható, így a rendszer valóban egy egyensúlyi állapotba került. A 9. ábrán jól látszik, hogy a potenciális energia értéke $-1,396 \cdot 10^6 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ és $-1,4 \cdot 10^6 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ között ingadozik.



9. ábra: A teljes rendszer potenciális energiája az idő függvényében az MD szimuláció során.

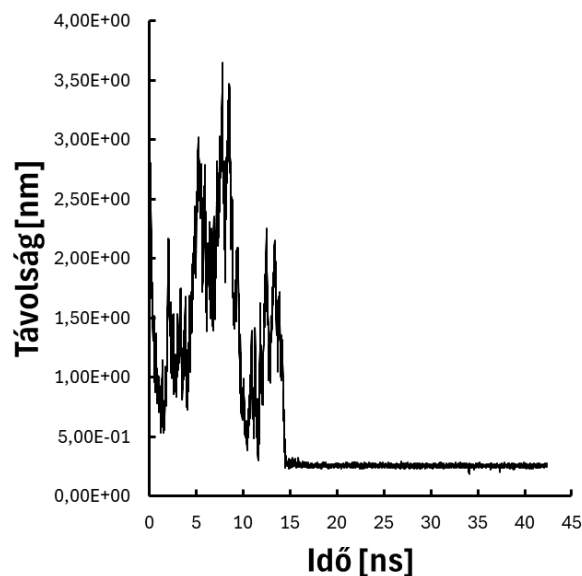
Az RMSD (Root-Mean-Square Deviation), azaz az átlagtól való négyzetes eltérésnek a négyzetgyöke mutatja meg, hogy a fehérje atomi koordinátái mennyire változtak a szimuláció során (10. ábra). A számadatokat a kezdeti állapottól (előszimuláció után) figyeltük, melynek értéke $0,116 \pm 0,022$ nm. Az előszimuláció után látható egy kisebb mértékű, 0,1 nm körüli változás. Az ábrán megfigyelhető egy felfelé majd lefelé ívelő görbe (púp), ami összefüggésben van a fehérje és a nanocső egymással való kölcsönhatásba kerülésével. Azaz a fehérje atomi koordinátái megváltoznak, amikor a nanocsőhöz kapcsolódik. Nagyobb ugrások azonban nincsenek benne, így bizonyos, hogy a fehérje nem megy át nagy szerkezeti változáson.

A kis változás a szimuláció elején jöhet a barosztát/termosztát megváltozásából is vagy a vizes fázissal való kölcsönhatásból.

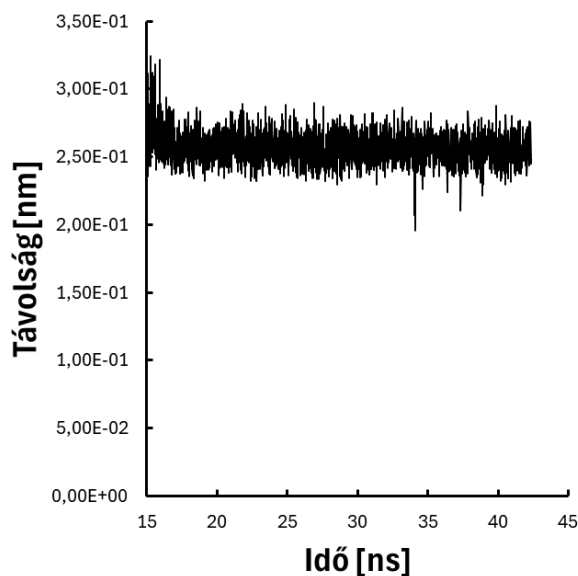


10. ábra: Az 1Aki fehérje gerincének RMSD-je az idő függvényében az MD szimuláció során.

Kezdetben a nanocső és a fehérje szabadon mozogtak a rendszerben, ez figyelhető meg a 11. ábra első 15 ns időtartama alatt. Ugyanebben az időszámban az is észrevehető, hogy az említett két molekula közelebb kerülnek, de nem megy végbe egy stabil megtapadás. Kb. 15 ns-tól egy jól észrevehető hirtelen nagyobb távolságcsökkenés figyelhető meg a fehérje és a szén nanocső között. A 2 molekula közötti távolág innentől 0,25 nm-re tehető, amit a 12. ábra mutat be részletesebben. A 15 ns utáni adatok alapján a távolság értéke $0,260 \pm 0,011$ nm. A két említett ábra jól mutatja a fehérje és a nanocső szoros kapcsolatát, ugyanis a kötődés után már nem távolodnak el egymástól a szimuláció végéig.

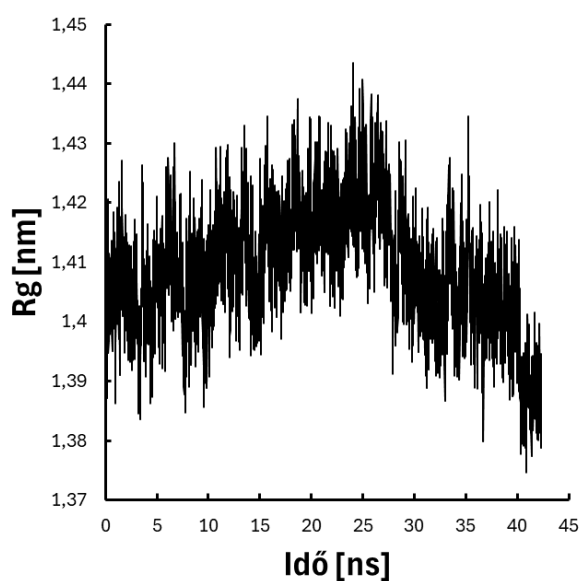


11. ábra: Az 1Aki fehérje és a szén nanocső közötti legközelebbi távolság az idő függvényében az MD szimuláció során.



12. ábra: Az 1Aki fehérje és a szén nanocső közötti legközelebbi távolság az idő függvényében a 15. ns után.

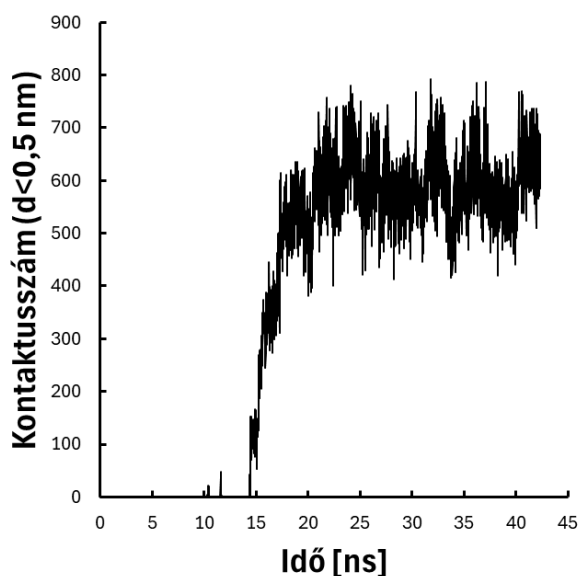
Az R_g (Radius of gyration) girációs sugár egy a fehérje köré illesztett gömb sugara, mely a tömörségét adja meg a vizsgált molekulának (13. ábra). Esetünkben a fehérjére számolt értéke $1,408 \pm 0,010$ nm. Az ábrán látható egy enyhe fokú változás, főleg 25 ns körül, ahol a fehérje kölcsönhatásba lép a nanocsővel. Az említett időpillanat után a fehérje összebb tömörödik, kompaktabbá válik. A változás nem nagy mértékű, de a tendencia érzékelhető.



13. ábra: Az 1Aki fehérje girációs sugara az idő függvényében az MD szimuláció során.

Eredmények és diszkusszió

A következő ábra (14. ábra) mutatja be, hogy hány olyan pont van a fehérje és a szén nanocső között, melyeknek a távolsága 0,5 nm alatt van. Ezt az értéket választottuk meg annak, hogy a 2 molekulát kölcsönhatásban lévőnek tudjuk be, hiszen ekkor már relevánsnak tekinthetők a kötések. Jól látszik a már fentebb említett jelenség, 15 ns körül kerülnek a résztvevő molekulák olyan közel egymáshoz, hogy kapcsolatot tudjanak létrehozni. Az is megfigyelhető, hogy egy időpillanatban 400 és 800 (átlagban 700) közötti olyan atom van, ami a kölcsönhatási távolságon belül helyezkedik el. Észrevehető, hogy a 10. ns környékén is jelentek meg közeli pontok, melyek közelebb voltak, mint a kritikus távolság, viszont utána el is távolodtak. Ez alátámasztja azt, amit már az előző ábráknál (12., 13. ábra) említettem, miszerint gyenge kölcsönhatás figyelhető meg a 15 ns előtt is, de azok nem maradtak stabilak.

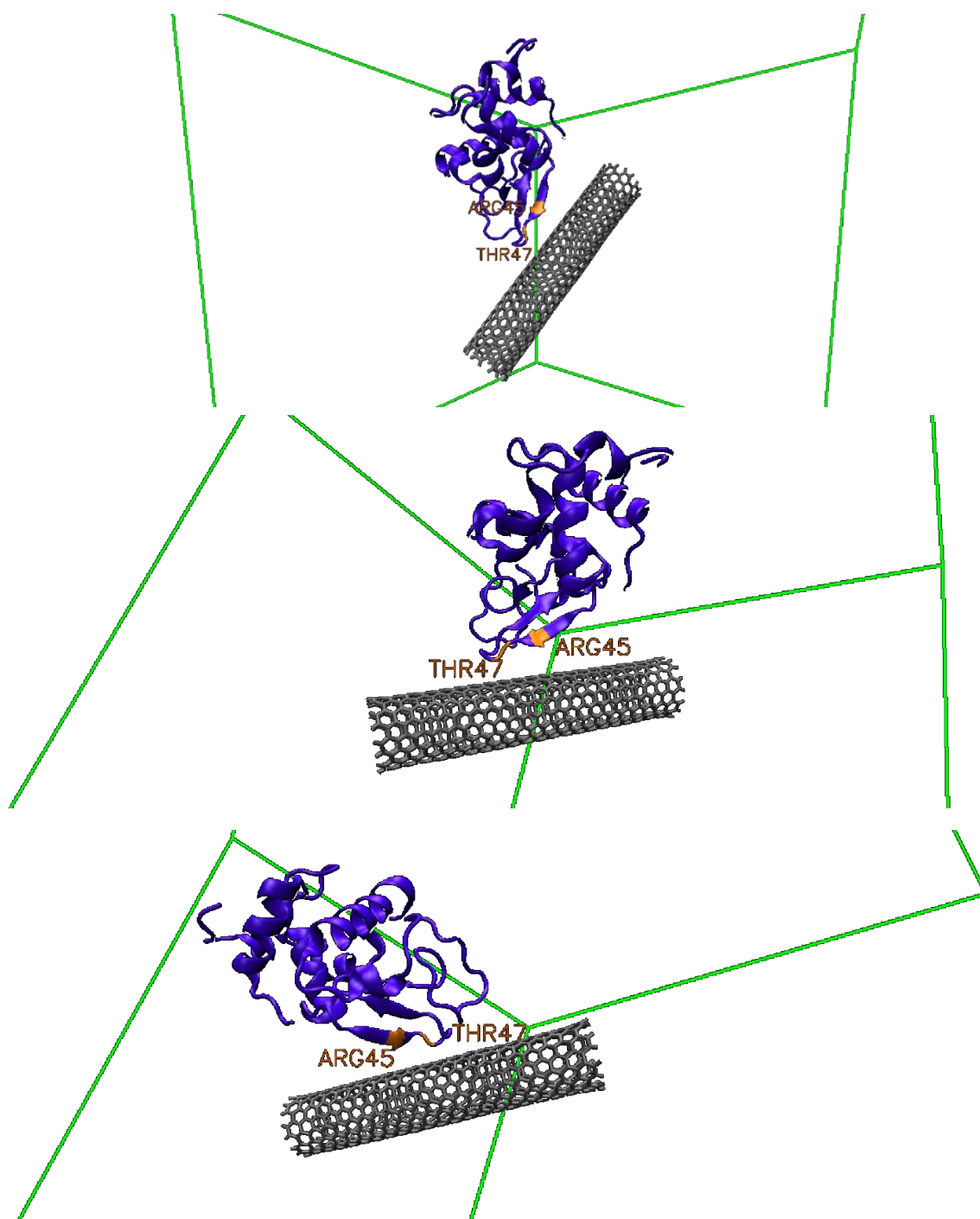


14. ábra: Az 1Aki fehérje és a szén nanocső közötti kontaktusszám (azaz mennyi atom van 0,5 nm távolságnál közelebb) az idő függvényében.

A 15. ábrán bemutatom a molekulák kölcsönhatását a 30. ns körül. Narancssárgával kiemeltem a töltött 45-ös arginin és a poláros 47-es treonin aminosavakat. Ez a két része a fehérjének, amik a legközelebb helyezkedtek el a nanocsőhöz a futás során. A jövőbeni szimulációkhoz és kísérletekhez is egyaránt fontos ezen részeknek a meghatározása. Továbbá tervben van a legközelebbi aminosavak lekövetése is minden időpillanatban. Ezekből

megtudhatjuk, hogy mely aminosavak kerültek a legközelebb (tapadtak) a nanocsőhöz, és mennyi ideig tartózkodtak ott.

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az 5 óráig futó, 45 ns-os szimuláció alatt megtörtént a kitapadás. A fehérje képes volt végigtapogatni a szén nanocsövet és megtalálni azokat a pontokat, ahol kötődni tudott.



15. ábra: Az Iki fehérje és a szén nanocső (CNT) kapcsolódása a 30. ns környékén. Színjelölés: Fehérje: lila, Nanocső: szürke, Doboz: zöld, Aminosavak nevei: narancssárga. A képeket a VMD 1.9.4 szoftverrel készítettem.

5 Összefoglalás

5.1 Dolgozat összefoglalása

A dolgozatban MD módszerekkel vizsgáltam a tojásfehérje lizozim (1Aki) és a szén nanocső (CNT) közötti kölcsönhatásokat.

A szimulációkhoz egy általunk létrehozott rendszerben a fehérjét és egy 5 nm hosszú szén nanocső modellt helyeztünk el. Ezt követően a szimulációs dobozt vízmolekulákkal és ionokkal töltöttük fel, ügyelve a töltésemlegességre. Az egyensúlyi állapotot két szakaszra bontottuk: 500 ps hosszú NVT és NPT után következett egy 45 ns hosszú szimuláció, 2 fs időlépésközzel. A futás alatt Verlet algoritmust, C-rescale barosztatót és Nosé-Hoover termosztátot használtunk. Ezt követően az eredményül kapott trajektória fájlok alapján elemeztük a fehérje és a szén nanocső közötti távolságot, az atomi koordináták változását (RMSD), valamint meghatároztuk a fehérje girációs sugarát. A szimulációkat a komondor szuperszámítógépen futtattuk.

A fehérje RMSD értéke $0,116 \pm 0,022$ nm-t kaptunk, ami azt mutatja, hogy a rendszer stabil, és az atomi koordináták jelentősen nem változtak. A fehérje girációs sugara $1,408 \pm 0,010$ nm volt, ami arra utal, hogy a fehérje a szimuláció során megtartotta kompakt, feltekeredett állapotát. A számítások alapján a fehérje és a szén nanocső közötti távolság 15 ns-ig ingadozó volt, majd egy szoros kölcsönhatás alakult ki, ahol a legközelebbi részek távolsága $0,260 \pm 0,011$ nm -re csökkent.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a szén nanocső és a tojásfehérje lizozim között adszorpciós kölcsönhatás jött létre, amelyek stabil kötést eredményezett. A fehérje a szimuláció alatt megőrizte kompakt, feltekeredett struktúráját. A kölcsönhatásban kulcsfontosságú szerepet játszott a töltött 45-ös arginin és a poláros 47-es treonin, amelyek a legközelebb helyezkedtek el a nanocsőhöz. A girációs sugár kis mértékű csökkenése azt támasztja alá, hogy a nanocső egyfajta stabilitást adhat a fehérjéknek.

5.2 Dolgozat és kísérlet kapcsolata

A dolgozat eredményei hozzájárultak a kutatócsoport cikkében⁹ tárgyalt problémák megoldásához, különösen a fehérje és szén nanocső kölcsönhatásainak megértésében. A tanulmány bemutatja, hogy a fotoszintetikus reakcióközpontok és nanocsövek relatív konformációja alapvetően meghatározza az elektrontranszfer hatékonyságát, azonban a preferált térbeli elrendezések a kísérletek során nem ismertek.

Ez a megközelítés lehetőséget biztosít arra, hogy a jövőben pontosabban feltérképezzük az reakciócentrumok és a nanostruktúrák közötti kölcsönhatásokat, így hozzájárulva a reakcióközpontok működésének jobb megértéséhez, valamint azok alkalmazásához bioelektronikai rendszerekben, például bioszenzorok fejlesztésében.

6 Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Szabó Tibor témavezetőmnek a szakdolgozat során adott hasznos ötleteit és jó tanácsait. Hálával tartozom Tarjányi Tamásnak -szintén témavezetőmnek-, aki a dolgozat megírásához tanácsaival, odafigyelésével, kutatásával és eszközeivel járult hozzá. Tisztaszívvvel köszönöm szüleimnek és testvéremnek a sok gondoskodást, ami elkísért a tanulmányaim során. Örülök, hogy becsatlakozhattam az SZTE SZAOK, TTIK, Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet munkájába.

Köszönöm a KIFÜ-nek (Informatikai Fejlesztési Kormányzati Ügynökség, Magyarország, <https://ror.org/01s0v4q65>), amiért hozzáférést biztosított számomra a Komondor magyarországi székhelyű HPC létesítményéhez.

7 Saját eredmények

Tudományos kérdések

- ✿ Megvizsgáltam a tojásfehérje lizozim (1Aki) és a szén nanocső (CNT) közötti kölcsönhatásokat molekuladinamikai (MD) szimulációkkal.
- ✿ Elemeztem a fehérje szerkezeti stabilitását és konformációs dinamikáját a nanocsőre való kapcsolódás során.
- ✿ Azonosítottam a kölcsönhatásban dominánsan résztvevő aminosavakat (arginin 45 és treonin 47).

Módszerek

- ☐ A GROMACS szoftvercsomagot használtam a szimulációkhoz, amit Ubuntu rendszeren futtattam.
- ☐ Összeállítottam a rendszert:
 - ☐ Letöltöttem a fehérje szerkezeti fájlt, majd létrehoztam a szén nanocsövet.
 - ☐ Összeraktam a szükséges topológiai és pozíciókorlátozó fájlokat.
 - ☐ Megalkottam a virtuális dobozt, melybe elhelyeztem a szén nanocsövet és a tojásfehérjét. Ezután feltöltöttem vízzel és ionokkal.
 - ☐ Lefuttattam az energia-minimalizációs, és egyensúlyi állapotkereséseket (NVT, NPT) a laptopomon, majd kiértékeltem.
 - ☐ Elemeztem a Komondorra beküldött éles szimulációk eredményeit (potenciális energia, RMSD, távolság, girációs sugár, kontaktusszám)

Eredmények

- Megállapítottam, hogy stabil adszorpciós kölcsönhatás alakult ki a lizozim és a CNT között.
- Megfigyeltem, hogy a lizozim megtartotta kompakt, feltekeredett szerkezetét a szimuláció során.
- Végül pedig azonosítottam a tojásfehérje és a szén nanocső közötti kulcsfontosságú kölcsönhatási helyeket, amelyek hozzájárultak a fehérje stabilitásához.
- Az alábbi táblázatban (1. táblázat) összefoglalom a kapott eredményeimet számszerűsítve:

Eredmény neve	Átlag	Szórás
Potenciális energia [kJ/mol]	-1 401 299,08	1 234,94
RMSD [nm]	0,116	0,022
Távolság [nm]	0,701	0,737
Távolság 15. ns után [nm]	0,737	0,011
R _g [nm]	1,409	0,010
Kontaktusszám ($d < 0,5$ nm) [db]	564	101

1.táblázat: Saját eredményeim számszerűsítve

8 Irodalomjegyzék

- (1) Karplus, M.; Petsko, G. A. Molecular dynamics simulations in biology. *Nature* **1990**, 347 (6294), 631-639. DOI: 10.1038/347631a0.
- (2) Sinha, S.; Tam, B.; Wang, S. M. Applications of Molecular Dynamics Simulation in Protein Study. *Membranes (Basel)* **2022**, 12 (9). DOI: 10.3390/membranes12090844 From NLM.
- (3) Hollingsworth, S. A.; Dror, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* **2018**, 99 (6), 1129-1143. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.08.011 From NLM.
- (4) Team, B. *Lysozyme: Structure, Sources, Mechanism, and Applications*. 2024. <https://biologyinsights.com/lysozyme-structure-sources-mechanism-and-applications/> (accessed 2024.11.08).
- (5) János, C.; Zsuzsanna, C. K. Enzimek. In *Élelmiszer-kémia*, Árpád, A., Tamás, B. Eds.; Mezőgazda Kiadó, 2003; p 273.
- (6) Carter, D., He, J., Ruble, J.R., Wright, B. *THE STRUCTURE OF THE ORTHORHOMBIC FORM OF HEN EGG-WHITE LYSOZYME AT 1.5 ANGSTROMS RESOLUTION*. <https://www.rcsb.org/structure/1AKI> (accessed 1997 19 November 1997).
- (7) Huang, W.; Eichenberger, A. P.; van Gunsteren, W. F. Molecular dynamics simulation of thionated hen egg white lysozyme. *Protein Sci* **2012**, 21 (8), 1153-1161. DOI: 10.1002/pro.2102 From NLM.
- (8) László, I.; Zsoldos, I. Molecular Dynamics Simulation of Carbon Nanostructures: The Nanotubes. In *Distance, Symmetry, and Topology in Carbon Nanomaterials*, Ashrafi, A. R., Diudea, M. V. Eds.; Springer International Publishing, 2016; pp 1-12.
- (9) Szabó, T.; Csekő, R.; Hajdu, K.; Nagy, K.; Sipos, O.; Galajda, P.; Garab, G.; Nagy, L. Sensing photosynthetic herbicides in an electrochemical flow cell. *Photosynth Res* **2017**, 132 (2), 127-134. DOI: 10.1007/s11120-016-0314-2 From NLM.
- (10) Lesnierowski, G.; Kijowski, J. Lysozyme. In *Bioactive Egg Compounds*, Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M., Schade, R. Eds.; Springer Berlin Heidelberg, 2007; pp 33-42.
- (11) Physics, A. I. o. *The Japanese physicist discovered carbon nanotubes in 1991*. 2017. <https://pubs.aip.org/physicstoday/Online/9378/Sumio-Iijima> (accessed 2024.11.08).
- (12) Zhang, C.; Wu, L.; de Perrot, M.; Zhao, X. Carbon Nanotubes: A Summary of Beneficial and Dangerous Aspects of an Increasingly Popular Group of Nanomaterials. *Front Oncol* **2021**, 11, 693814. DOI: 10.3389/fonc.2021.693814 From NLM.
- (13) Popov, V. N. Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2004**, 43 (3), 61-102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mser.2003.10.001>.
- (14) Dai, H. Carbon Nanotubes: Synthesis, Integration, and Properties. *Accounts of Chemical Research* **2002**, 35 (12), 1035-1044. DOI: 10.1021/ar0101640.
- (15) Pöhls, J.-H.; Johnson, M. B.; White, M. A.; Malik, R.; Ruff, B.; Jayasinghe, C.; Schulz, M. J.; Shanov, V. Physical properties of carbon nanotube sheets drawn from nanotube arrays. *Carbon* **2012**, 50 (11), 4175-4183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.04.067>.
- (16) Tamás, T. Titán felületek és biomolekulák kölcsönhatásainak modellezése molekuladinamikai módszerekkel. Szegedi Tudományegyetem, Szeged, 2023.
- (17) András, d. S. Bevezetés a bioinformatikába. ELTE TTK Biológiai Fizika Tanszék; MTA SZBK Enzimológiai Intézete: 2001.
- (18) Brooks, B. R.; Brooks, C. L., 3rd; Mackerell, A. D., Jr.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; et al. CHARMM: the biomolecular

- simulation program. *J Comput Chem* **2009**, 30 (10), 1545-1614. DOI: 10.1002/jcc.21287 From NLM.
- (19) Hess, B.; Kutzner, C.; van der Spoel, D.; Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2008**, 4 (3), 435-447. DOI: 10.1021/ct700301q.
- (20) Zoltán, N. A Hofmeister effektus vizsgálata szimulációs módszerekkel Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Fizika Doktori Iskola Szeged, 2019.
- (21) González, M. A. Force fields and molecular dynamics simulations. *JDN* **2011**, 12, 169-200.
- (22) Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J Comput Chem* **2004**, 25 (13), 1656-1676. DOI: 10.1002/jcc.20090 From NLM.
- (23) Mandal, D.; Shukla, K. A.; Ghosh, A.; Gupta, A.; Dhabliya, D. Molecular Dynamics Simulation for Serial and Parallel Computation Using Leaf Frog Algorithm. In *2022 Seventh International Conference on Parallel, Distributed and Grid Computing (PDGC)*, 25-27 Nov. 2022, 2022; pp 552-557. DOI: 10.1109/PDGC56933.2022.10053161.
- (24) Spreiter, Q.; Walter, M. Classical Molecular Dynamics Simulation with the Velocity Verlet Algorithm at Strong External Magnetic Fields. *Journal of Computational Physics* **1999**, 152 (1), 102-119. DOI: <https://doi.org/10.1006/jcph.1999.6237>.
- (25) Ke, Q.; Gong, X.; Liao, S.; Duan, C.; Li, L. Effects of thermostats/barostats on physical properties of liquids by molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Liquids* **2022**, 365, 120116. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120116>.
- (26) Höltzl, T.; Veszprémi, T. *Kémiai szimulációk az atomoktól a vegyipari reaktorokig*; 2019. DOI: 10.1556/9789634541714.
- (27) *Ubuntu: Enterprise Open Source and Linux*; Canonical: London, 2004. <https://ubuntu.com/> (accessed).
- (28) KIFÜ. Komondor. 2024. <https://hpc.kifu.hu/hu/komondor> (accessed).
- (29) Ahmed, S.; John, P.; Paracha, R. Z.; Bhatti, A.; Guma, M. Docking and Molecular Dynamics Study to Identify Novel Phytobiologics from *Dracaena trifasciata* against Metabolic Reprogramming in Rheumatoid Arthritis. *Life (Basel)* **2022**, 12 (8). DOI: 10.3390/life12081148 From NLM.
- (30) group, M. *MacKerell Lab Homepage*. University of Maryland School of Pharmacy, https://mackerell.umaryland.edu/charmm_ff.shtml#gromacs (accessed).
- (31) Mark, P.; Nilsson, L. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *The Journal of Physical Chemistry A* **2001**, 105 (43), 9954-9960. DOI: 10.1021/jp003020w.
- (32) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, 79 (2), 926-935. DOI: 10.1063/1.445869 (accessed 11/9/2024).
- (33) Boonstra, S.; Onck, P. R.; van der Giessen, E. CHARMM TIP3P Water Model Suppresses Peptide Folding by Solvating the Unfolded State. *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, 120 (15), 3692-3698. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b01316.
- (34) team, G. d. *gmx x2top*. Sphinx and @pradyunsg's Furo, 2024. <https://manual.gromacs.org/current/onlinehelp/gmx-x2top.html> (accessed).

- (35) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **1996**, *14* (1), 33-38, 27-38. DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5 From NLM.
- (36) team, G. d. *gmx insert-molecules*. Sphinx and @pradyunsg's Furo, 2024. <https://manual.gromacs.org/current/onlinehelp/gmx-insert-molecules.html> (accessed).