

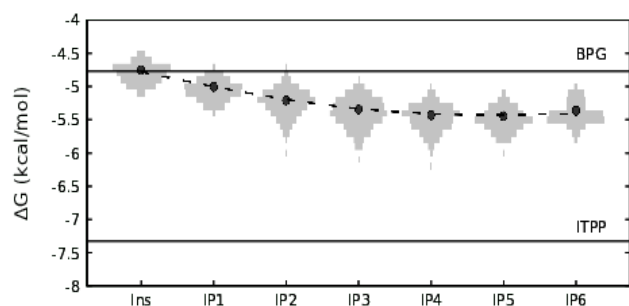
Opis wyników badań w projekcie DI2017 007947

Politechnika Poznańska, Instytut Fizyki

Celem projektu było badanie mechanizmu transportu kofaktorów hemoglobiny – fosforanów inozytoli metodami teorii funkcjonału gęstości (*density functional theory* – DFT) i dynamiki molekularnej (*molecular dynamics* – MD) poprzez badanie oddziaływania białko–ligand. Zestawy parametrów, na podstawie których prowadzona jest dynamika molekularna (tzw. pola siłowe), zawierają dane o oddziaływaniach w aminokwasach, jonach i często wzbogacane są o podstawowe cukry i fosfolipidy. Kluczowym zagadnieniem na początku była więc odpowiednia parametryzacja małych molekuł (ligandów) podlegających badaniu.

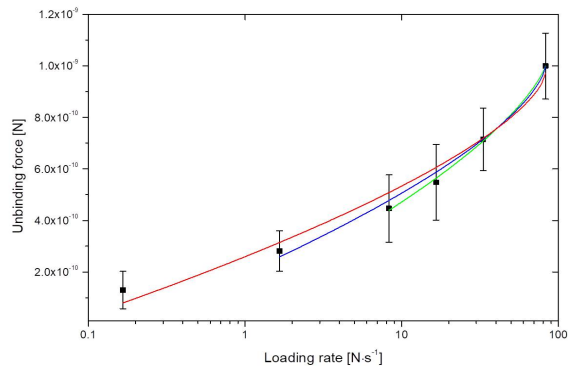
W tym celu przeprowadzono obliczenia DFT z wykorzystaniem różnych potencjałów korelacyjno-wymiennych tak, by otrzymać geometrię ligandów jak najbardziej zgodną z metodami chemii kwantowej MP2/6-31G* i MP2/cc-pVDZ wykorzystywanymi w parametryzacji wybranego do dalszych obliczeń pola siłowego CHARMM. Zgodnie z obecnymi w literaturze przewidywaniami, połączenie części wymiany elektronowej funkcjonałów PBE_{0.5}revPBE_{0.5} (Perdew-Burke-Ernzerhoff i revised PBE) z korelacją w parametryzacji Lee-Murray-Kong-Lundqvist-Langreth najlepiej odzwierciedla geometrię i względne energie różnych konformacji czystego inozytoli (błąd względny poniżej 1% względem wyników MP2/cc-pVDZ). Sam potencjał PBE daje jednak dobrą zgodność geometrii molekuly z dostępnymi w literaturze wynikami MP2/6-31G* i ta parametryzacja została wykorzystana w dalszej części badań [a, c]. Stosowanie DFT pozwala na efektywne skalowanie obliczeń poprzez dostęp do wielu implementacji w formie wolnego oprogramowania (jak wykorzystywana w projekcie SIESTA).

Poza zbieżnością geometrii z metodami chemii kwantowej, istotnym benefitem z wykorzystania fizycznych metod DFT byłaby możliwość symulacji agregatów cząsteczek, układów periodycznych, w tym cząsteczek osadzonych na powierzchni. Weryfikacja parametrów fizycznych uzyskiwanych metodą DFT możliwa jest poprzez porównanie wyników z wynikami eksperymentalnymi uzyskanymi z wykorzystaniem spektroskopii Ramana. Pomiar takie zostały przeprowadzone, a odwzorowanie drgań ν P-O-C oraz oddychających pierścienia węglowego uznane zostało za dobry wyznacznik poprawności parametryzacji obliczeń. Długości wiązań i wartości kątów pomiędzy atomami w cząsteczce powiązanych z tymi drganiami prezentują największe różnice co do wartości pomiędzy różnymi potencjałami korelacyjno-wymiennymi (rzędu 0.02Å długości wiązań i 2.1° wartości kątów) [a, c].

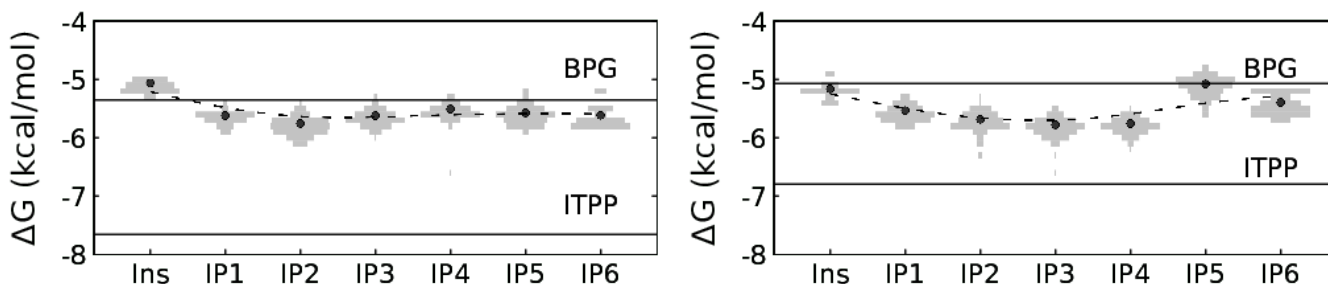


W założony sposób zoptymalizowane zostały wszystkie konformacje fosforanów inozytoli wyznaczone bazując na centralnym pierścieniu w konformacji krzesła i grupach funkcyjnych (hydroksylowych albo fosforanowych) znajdujących się w jego płaszczyźnie (położenie ekwatorialne) albo prostopadle do niej (położenie aksjalne). Cząsteczki te zostały następnie zadokowane do hemoglobiny celem wyznaczenia energii oddziaływania (różnica energii swobodnej Gibbsa). Wszystkie fosforany (od mono- do heksakisfosforanu) wykazują się średnią energią oddziaływania w zakresie 5 – 5.5 kcal mol⁻¹, wyższą niż bisfosfoglicerynian (BPG), naturalny kofaktor hemoglobiny i niższą niż trispirofosforan mio-inozytoli (ITPP). Dodatkowo nie wykazano znaczącego wpływu konformacji molekuly na oddziaływanie z hemoglobina [I].

Po wykonaniu dokowania molekularnego, dla wybranych molekuł przeprowadzona została dynamika molekularna w wodzie traktowanej *explicitie* (model TIP3P) i w obecności jonów zubożających cały układ. Następnie, z wykorzystaniem sterowanej dynamiki molekularnej (*steered molecular dynamics* – SMD), zasymulowany został eksperyment tzw. dynamicznej spektroskopii sił (*dynamic force spectroscopy* – DFS), który może zostać przeprowadzony z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych (*atomic force microscope* – AFM). Następnie do uzyskanych wyników dopasowany został model Dudko-Hummera-Szabo termicznie



aktywowanego zerwania wiązania z wykorzystaniem zewnętrznej siły (po prawej). Dla heksakisfosforanu mio-inozolu wykazał on słabe oddziaływania o średniej wartości ΔG w zakresie 5-7 kT (zakładając $T = 300$ K), czyli do ok $4.2 \text{ kcal mol}^{-1}$. Jest to wartość nieco niższa niż otrzymana z dokowania molekularnego.



Przeprowadzone w ostatnim etapie badań, wielokrotne dokowanie wszystkich konformacji fosforanów inozytoli do kanału transportowego AE1, wykazało podobne wartości energii wiązania w pobliżu kieszeni Ser465, Ser725, Thr727, Thr528 oraz Arg730, Glu681, znajdujących się odpowiednio wewnątrz/na zewnątrz kanału i odpowiadających za transport małych jonów, który jest główną funkcją pełnioną przez ten kanał transportowy. Tutaj również energia wiązania ITPP jest zdecydowanie najwyższa i wyższa w pobliżu części kanału odpowiedzialnej za transport jonów (powyżej po lewej) niż w sąsiedztwie membrany (powyżej po prawej), co sugerować może dwustopniowy mechanizm transportu, któremu podlega ITPP. Jednocześnie zaobserwowano łatwiejsze wiązanie się ligandów w sąsiedztwie sfingomieliny, co może sugerować istotną rolę sfingolipidów w transporcie i rozpoznaniu molekularnym ITPP.

Opracowana w projekcie metodologia optymalizacji geometrii ligandów, dokowania molekularnego i symulowanej separacji wykorzystana została również do badania potencjalnych inhibitorów kluczowych białek SARS-CoV-2 [III], a analiza przestrzeni konformacyjnej (w tym przypadku konfiguracyjnej) została wykorzystana z sukcesem do badania układu krystalicznego badanego w ramach równolegle realizowanej tematyki [IV].

[a] W. Marciniak, J. Marciniak, A. Ptak, *Broad range ab initio conformational and electronic structure analysis of inositol phosphates for accurate description of protein-ligand and drug-vehicle complexes*, **NanoTech Poland**, 9-11 czerwca 2022

[b] W. Marciniak, J. Marciniak, J. Łasut-Balcerzak, K. Olszewska, A. Ptak, *Combined raman spectroscopy and broad range density functional theory analysis of inositol phosphates and their conformations*, **OpenReadings 2022**, 15-18 marca 2022

[c] W. Marciniak, J. Marciniak, A. Ptak, *Modelowanie cząsteczek fosforanów inozytoli do dokowania molekularnego*, **KK NANO 2022**, 3-8 lipca 2022

[I] W. Marciniak, J. Marciniak, A. Ptak, *Molecular simulation and quantitative characterization of inositol phosphates – hemoglobin interactions*, **ChemRxiv**

[II] W. Marciniak, J. Marciniak, A. Ptak, *Role of band 3 transmembrane domain in inositol phosphates transport studied by molecular docking*, **ChemRxiv**

[III] W. Marciniak, J. Łasut-Balcerzak, J. Marciniak, A. Ptak, *Steered molecular dynamics and simulated dynamic force spectroscopy studies of SARS-CoV-2 functional proteins inhibition*, **ChemRxiv**

[IV] W. Marciniak, M. Werwiński, *Magnetic properties of tetragonally strained Fe-Co alloys doped with C: a first principle study*, **arXiv**