



Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Diplomsko delo

# **Vpliv mikrovalov na zvijanje $\beta$ -peptida: Računalniški pristop**

september, 2018

Simon Kocbek



Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Simon Kocbek

# **Vpliv mikrovalov na zvijanje $\beta$ -peptida: Računalniški pristop**

Diplomsko delo

Maribor, 2018



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

# Vpliv mikrovalov na zvijanje $\beta$ -peptida: Računalniški pristop

Diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje

Študent: Simon Kocbek  
Študijski program: univerzitetni študijski program I. stopnje Kemija  
Predvideni strokovni naslov: diplomirani/a kemik/kemičarka (UN)  
Mentor: izr. prof. dr. Urban Bren  
Komentor: asist. Martin Gladović, mag. kem.

Maribor, 2018



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Številka: K1014037/1  
Datum: 02.10.2017

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Statut UM–UPB 12, Uradni list RS, št. 29/2017) izdajam:

### SKLEP O ZAKLJUČNEM DELU

**Simon Kocbek**, študent-u/-ki univerzitetnega študijskega programa 1. stopnje KEMIJA, se dovoljuje izdelati zaključno delo.

Mentor/-ica: izr. prof. dr. Urban Bren

Somentor/-ica: asist. Martin Gladovič, mag. kem.

**Naslov zaključnega dela:**

VPLIV MIKROVALOV NA ZVIJANJE  $\beta$ -PEPTIDA: RAČUNALNIŠKI PRISTOP

**Naslov zaključnega dela v angleškem jeziku:**

THE EFFECT OF MICROWAVE IRRADIATION ON THE FOLDING OF  $\beta$ -PEPTIDES: A COMPUTATIONAL APPROACH

Rok za izdelavo in oddajo zaključnega dela je 30.09.2018. Zaključno delo je potrebno izdelati skladno z »Navodili za izdelavo zaključnega dela« in ga v treh izvodih oddati v pristojnem referatu članice. Hkrati se odda tudi izjava mentor-ja/-ice in morebitne/-ga somentor-ja/-ice o ustreznosti zaključnega dela.

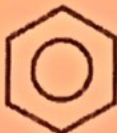
Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na Senat članice v roku 10 delovnih dni od dneva prejema sklepa.

DEKAN

red. prof. dr. Zdravko Kravanja

Obvestiti:

- kandidat-a/-ko,
- mentor-ja/-ico,
- somentor-ja/-ico,
- odložiti v arhiv



FAKULTETA ZA KEMIJO IN  
KEMIJSKO TEHNOLOGIJO



## Kazalo

Kazalo .....	I
Izjava .....	II
Zahvala .....	III
Povzetek.....	IV
Abstract.....	V
Seznam tabel.....	VI
Seznam slik.....	VII
Uporabljeni simboli in kratice .....	IX
1 Uvod.....	1
1.1 Opredelitev problema .....	1
1.2 Pregled literature.....	1
1.3 Cilji in hipoteze .....	1
2 Teoretske osnove.....	2
2.1 Elektromagnetno valovanje .....	2
2.2 Beta peptid.....	4
2.3 Metode računalniške kemije.....	5
2.3.1 Molekulska mehanika (MM).....	6
2.3.2 Molekularna dinamika.....	10
2.4 Uporabljeni računalniški programi.....	12
2.5 Analiza rezultatov MD simulacij.....	13
2.5.1 RMSD.....	13
2.5.2 RMSF.....	13
2.5.3 Rgyr .....	14
2.5.4 Tser .....	14
2.5.5 Hbond .....	15
2.5.6 Analiza klastrov .....	15
3 Eksperimentalni del.....	16
3.1 Računalniška oprema.....	16
3.2 Topologija molekule beta peptida .....	17
3.3 Energijska minimizacija beta peptida.....	18
3.4 Molekulska dinamika beta peptida .....	19
3.5 Analiza trajektorij.....	22
4 Rezultati in diskusija .....	26
4.1 Rezultati RMSD analize .....	26
4.2 Rezultati RMSF analize.....	30
4.3 Rezultati rgyr analize.....	32
4.4 Rezultati analize razdalje med prvim in zadnjim fragmentom vijačnice .....	36
4.5 Rezultatati analize vodikovih vezi.....	39
4.6 Rezultati analize gruč .....	42
4.7 Razultati analize neveznih energij.....	45
4.8 Vizualni prikaz končnih struktur .....	49
5 Zaključek.....	54
6 Literatura .....	55
7 Življenjepis.....	56
.....	56

## Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal/a sam/a, prispevki drugih so posebej označeni.  
Pregledal/a sem literaturo s področja diplomskega dela po naslednjih geslih:

**Vir:** Google Scholar (<https://scholar.google.com>)

<b>Gesla:</b>	<b>Število referenc</b>
microwaves AND protein conformation	2
protein AND misfolding AND disease	2
GROMOS	1
molecular dynamic simulations	4
beta peptide	1
mobilephone AND health effects	1

**Skupno število pregledanih člankov:** 11

**Skupno število pregledanih knjig:** 4

Maribor, september 2018

Simon Kocbek  
podpis

## Zahvala

Zahvaljujem se mentorju, izr. prof. dr. Urbanu Brenu, za podajanje znanja iz področja računalniške kemije, ki je bilo potrebno za uspešno izvedbo diplomskega dela. Velika zahvala tudi mag. Martinu Gladoviću za pomoč in podporo pri izvajanju raziskav.

Še posebjaj pa bi se zahvalil prijateljem in družini, ki so mi ob izvajanju diplomskega dela stali ob strani tekom celotnega študija.



## Vpliv mikrovalov na zvijanje $\beta$ -peptida: Računalniški pristop

### Povzetek

Tehnologija je iz dneva v dan bolj integrirana v naše življenje. Hiter razvoj nam je prinesel veliko naprav, ki nam olajšujejo vsakodnevno življenje. Veliko število teh komunikacijskih, navigacijskih in spektroskopskih naprav pri delovanju izseva mikrovalove. Zaradi visoke izpostavljenosti mikrovalovom je pomembno, da preučimo morebitne negativne vplive te tehnologije. V ta namen smo se odločili, da raziščemo vpliv mikrovalov na gardnike naših teles - peptide. Ubrali smo računalniški pristop in s pomočjo molekulske dinamike preučevali vpliv mikrovalov na zvijanje betapeptida. Z uporabo razklopljenih termostatov smo ločeno nastavljali rotacijsko, translacijsko in vibracijsko temperaturo sistema betapeptida v raztopini. Primerjali smo zvijanje peptida pod pogoji klasičnega in mikrovalovnega segrevanja in prišli do zaključka, da rotacijsko gibanje polarnega metanola prekine vodikove vezi med topilom in peptidom, kar vodi do tvorbe novih vodikovih vezi med atomi vijačnice. Posledica tega je kompaktnjše zvitje betapeptida. Prav taki strnjeni agregati lahko vodijo do nastanka amiloidnih nitk, ki so povezane z nevrodegenerativnimi boleznimi, kot je Alzheimerjeva bolezen.

**Ključne besede:** Mikrovalovi, simulacije molekulske dinamike, betapeptid, zvijanje peptidov.

**UDK:**

## **The effect of microwave irradiation on the folding of $\beta$ -peptides : A computer approach**

### **Abstract**

Technology is an ever more integrated part of our lives. The fast evolution brought us many gadgets that ease our lives. Microwaves play a vital role in communication, navigation and spectroscopy devices. Because of the omnipresent microwave radiation it is important to determine the possibility of any detrimental health effects. For the propose we decided to investigate the effect of microwave irradiation on the building blocks of our body, peptides. We chose a computational approach and with the help of molecular dynamics analyzed the folding behaviour of a beta peptide in methanol under microwave radiation. The decoupled thermostats allowed us to control the translational, vibrational and rotational temperatures of the system with the betapeptide in solution separately. We compared the folding behaviour under conventional heating and microwave heating and came to the conclusion that the increased rotational motion of the methanol molecules, that is caused by the microwaves, breaks of the H-bonds between the solvent and solute and leads to increased formation of intramolecular H-bonds. This results in a more compact folding of the beta peptide. Such peptides can aggregate and form amyloid fibrils which have been linked to neurodegenerative didorders like Alzheimer disease.

**Key words:** Microwaves, simulations of molecular dynamics, beta-peptide, peptide folding.

**UDK:**

## Seznam tabel

Tabela 4-1: Rezultati RMSD analize. ....	26
Tabela 4-2: Rezultati RMSF analize.....	30
Tabela 4-3 Rezultati analize radija sukanja .....	32
Tabela 4-4: Razultati analize razdalje med prvim in zadnjim atomom vijačnice.....	36
Tabela 4-5: Rezultati analize prisotnih vodikovih vezi, ki se tvorijo med atomi vijačnice....	39
Tabela 4-6: Rezultati analize klastrov.....	42

## Seznam slik

Slika 2-1 Elektromagnetni spekter.....	2
Slika 2-2 Dipolarna polarizacija vode .....	3
Slika 2-3 Beta peptid .....	4
Slika 2-4 Krivulja Lennard-Jones potenciala .....	8
Slika 3-1 Datoteka topologije .....	17
Slika 3-2 Beta peptid po termalizaciji in ekvibrilaciji.....	18
Slika 3-3 .arg datoteka za rotacijsko temperaturo 400 K.....	19
Slika 3-4 .imd datoteka za rotacijsko temperaturo 400 K .....	20
Slika 3-5 .arg datoteka za energijsko analizo .....	22
Slika 3-6 .arg datoteka za rmsd, ki upošteva vse aminokislinske ostanke .....	22
Slika 3-7 .arg datoteka, ki upošteva le aminokislinske ostanke od drugega do predzadnjega. ....	23
Slika 3-8 .arg. datoteka za RMFS analizo .....	23
Slika 3-9 Pretvorba trajektorije v format PDB za analizo s programom VMD.....	23
Slika 3-10 Primer .arg datoteke za tser program .....	24
Slika 3-11 Primer .arg datoteke za analizo vodikovih vezi .....	24
Slika 3-12 Primer .arg datoteke za program rmsdmat .....	25
Slika 3-13 Primer .arg datoteke za analizo clustrov .....	25
Slika 3-14 Primer .arg datoteke za postcluster analizo.....	25
Slika 4-1 RMSD vrednosti za simulacijo sistema pri 300 K.....	27
Slika 4-2 RMSD vrednosti za simulacijo klasičnega segrevanja pri 400 K.....	28
Slika 4-3 RMSD vrednosti za simulacijo mikrovalovnega segrevanja pri 400 K.....	28
Slika 4-4 RMSD vrednosti za simulacijo klasičnega segrevanja pri 600 K.....	29
Slika 4-5 RMSD vrednosti za simulacijo mikrovalovnega segrevanja pri 600 K.....	29
Slika 4-6 Grafičen prikaz rezultatov RMSF analize.....	31
Slika 4-7 Radij sukanja za referenčni primer pri 300K .....	33
Slika 4-8 Radij sukanja za mikrovalovno segrevanje pri 400K .....	33
Slika 4-9 Radij sukanja za klasično segrevanje pri 400 K.....	34
Slika 4-10 Radij sukanja za mikrovalovno segrevanje pri 600 K .....	35
Slika 4-11 Radij sukanja za klasično segrevanje pri 600 K.....	35
Slika 4-12 Razdalja med prvim in zadnjim fragmentom v sistemu na 300 K.....	36
Slika 4-13 Razdalja med prvim in zadnjim fragmentom pri klasičnem segrevanju na 400 K.....	37
Slika 4-14 Razdalja med prvim in zadnjim fragmentom pri mikrovalovnem segrevanju na 400 K .....	37
Slika 4-15 Razdalja med prvim in zadnjim fragmentom pri klasičnem segrevanju na 600 K.....	38
Slika 4-16 Razdalja med prvim in zadnjim fragmentom pri mikrovalovnem segrevanju na 600K .....	38
Slika 4-17 Število prisotnih intramolekularnih vodikovih vezi in njihovo tekoče povprečje za sistem pri 300K.....	39
Slika 4-18 Število prisotnih intramolekularnih vodikovih vezi in njihovo tekoče povprečje za navadno segrevanje pri 400K .....	40
Slika 4-19 Število prisotnih intramolekularnih vodikovih vezi in njihovo tekoče povprečje za mikrovalovno segrevanje pri 400K .....	40
Slika 4-20 Število prisotnih intramolekularnih vodikovih vezi in njihovo tekoče povprečje za klasično segrevanje pri 600K .....	41
Slika 4-21 Število prisotnih intramolekularnih vodikovih vezi in njihovo tekoče povprečje za mikrovalovno segrevanje pri 600K .....	41

Slika 4-22 Kumulativno število gruč za sistem pri 300 K .....	42
Slika 4-23 Kumulativno število gruč za klasično segrevanje pri 400 K.....	43
Slika 4-24 Kumulativno število klastrov za mikrovalovno segrevanje pri 400 K.....	43
Slika 4-25 Kumulativno število klastrov za klasično segrevanje pri 600 K.....	44
Slika 4-26 Kumulativno število klastrov za mikrovalovno segrevanje pri 600 K.....	44
Slika 4-27 Nevezna energija pri navadnem segrevanju 300 K.....	46
Slika 4-28 Nevezna energija pri navadnem segrevanju 400 K.....	47
Slika 4-29 Nevezna energija pri mikrovalovnem segrevanju 400 K.....	47
Slika 4-30 Nevezna energija pri klasičnem segrevanju 600 K.....	48
Slika 4-31 Nevezna energija pri mikrovalovnem segrevanju 600 K.....	48
Slika 4-32 Vizualni prikaz molekule beta peptida pri 300 K.....	49
Slika 4-33 Vizualni prikaz molekule beta peptida pri mikrovalovnem segrevanju na 400K.....	50
Slika 4-34 Vizualni prikaz beta peptida pri klasičnem segrevanju na 400K.....	51
Slika 4-35 Vizualni prikaz beta peptida pri mikrovalovnem segrevanju na 600K.....	52
Slika 4-36 Vizualni prikaz beta peptida pri klasičnem segrevanju na 600K.....	53

## Uporabljeni simboli in kratice

### Simboli

$a$	Pospešek (m/s <sup>2</sup> )
$b$	Odvod pospeška (m/s <sup>3</sup> )
$E$	Energija (kcal/mol)
$h$	Planckova konstanta (m <sup>2</sup> kg/s)
$K_l, K_\theta, K_\varphi$	Harmonske konstante (različne enote)
$L$	Razalja oziroma lega (m)
$n$	Multipliciteta (/)
$N_t$	Število časovnih korakov
$p$	Gibalna količina (kg m/s)
$r$	Razdalja med atomi (Å)
$t$	Čas (s)
$u$	Velikost dihedralnega kota (rad)
$v$	Hitrost (m/s)
$q$	Velikost naboja (Å s)
$\Delta$	Razlika/sprememba (/)
$\theta$	Valenčni kot (rad)
$\sigma$	Razdalja trka (m)
$\epsilon_0$	dielektrična konstanta (Å s/V m)
$\partial$	Parcialni odvod (/)
$\varphi$	Torzijski kot (rad)
$\gamma$	Fazni kot (rad)
$\lambda$	Valovna dolžina (nm)

### Kratice

DFT	Teorija gostotnih funkcionalov (ang. Density Functional Theory)
EMV	Elektro magnetno valovanje
EP	Električno polje
IR	Infrardeče valovanje
MD	Molekulska dinamika
MM	Molekulska mehanika
NMR	Nuklearna magnetna resonanca (ang. Nuclear Magnetic Resonance)
PDB	podatkovana baza proteinov (ang. Protein Data Bank)
RMSD	Koren povprečnega kvadrata razlike (ang. Root Mean Square Deviation)
RMSF	Koren povprečnega kvadrata fluktuacije (ang. Root Mean Square Fluctuation)
UV	Ultravijolično valovanje
VMD	Visual Molecular Dynamics
XRD	Difrakcija z rentgenskimi žarki (ang. X-ray Diffraction)



# 1 Uvod

## 1.1 Opredelitev problema

Mikrovalovi so postali del našega vsakdanjega življenja. Ta neviden del elektromagnetnega spektra se uporablja od raziskovanja vesolja do pogrevanja jedi. Pogosta izpostavljenost bi lahko imela vpliv na naše zdravje zaradi vpliva na konformacijo proteinov brez znatnega segrevanja. Funkcionalnost proteina je povezana z njegovo tridimenzionalno strukturo. Zaradi tega ima vsaka sprememba v geometriji proteina, še posebej aktivnega mesta, potencial spremembe biološke vloge. [1] Napačno zvijanje lahko vodi do agregacije proteinov in do tvorbe amiloidnih nitk. [2] Prisotnost proteinskih agregatov in amiloidnih nitk je povezana z nevrodegenerativnimi boleznimi kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen. [3] Menimo, da ni mogoče popolnoma razumet vplivov na zdravje brez poznavanja molekularnih mehanizmov mikrovalovnega sevanja in njegovega delovanja na organizem. Naš cilj je, da z uporabo metod računalniške kemije preučimo vplive mikrovalov na strukturno stabilnost bioloških makromolekul.

## 1.2 Pregled literature

Ob pregledu literature smo naleteli na študijo, ki je preučevala vpliv mikrovalov na inzulin. Za simulacije mikrovalov so uporabili kratkotrajni temperaturni stres in redukcijo disulfidnih mostov, ki bi naj ponazarjala netermični vpliv. Simulacije molekulske dinamike (MD) so bile analizirane na vpliv termalnega in kemijskega stresa na konformacijo, pot zvijanja proteina, razlike med zvito in nativno obliko, dostopne površine za topilo in prisotnost vodikovih vezi. Odkrili so, da največje spremembe povzroči redukcija disulfidnih vezi in termičnega stresa. Z višanjem temperature se je stopnja razvijanja in prisotnost vodikovih vezi med vodo in proteinom povečala. [4].

Izvedene so bile študije MD, ki so raziskovale vpliv mikrovalov na nepolarne topljence v polarnih topilih. Rezultati kažejo na porast urejenosti hidrofobnih topljencev v rotacijsko vzbujeni vodi, kar je verjetno posledica destabilizacija prve hidratacije lupine. Zanimivo je bilo obnašanje nepolarnih polimerov, ki so se pri teh pogojih začeli zvijati v kompaktne agregate. [5] Ker so peptidi in proteini biološki polimeri nam, to daje iztočnico za našo hipotezo.

## 1.3 Cilji in hipoteze

Cilj diplomske naloge je s pomočjo ločenih termostatov simulirati mikrovalove in z energijsko in strukturno analizo določiti vpliv na zvijanje beta peptide.

Na podlagi pregledane literature sklepamo, da bo prekinitev vodikovih vezi med topilom in topljencem vodila do skrčenja in bolj kompaktne konformacije kot pri klasičnem segrevanju.



## 2 Teoretske osnove

### 2.1 Elektromagnetno valovanje

Elektromagnetno valovanje (EMV) se nanaša na valovanje elektromagnetnega polja, ki se širi skozi prostor in čas. V klasični fiziki je EMV sočasno osciliranje električnega in magnetnega polja pravokotno na smer širjenja. V vakuumu je hitrost širjenja enaka svetlobni hitrosti (svetloba je EMV). EMV oddajajo električno nabiti delci, ki so podvrženi pospeševanju. Valovanje lahko interagira z drugimi nabitimi delci, saj imajo svojo gibalno količino, vrtilno količino in energijo, ki jo lahko prenesejo. [6]

V kvantni mehaniki obravnavamo EMV kot fotone, delce z mirovno maso nič, ki so diskretni paketi (kvanti) energije. Energijo teh delcev opiše enačba 2.1.

$$E = h\nu \quad (2-1)$$

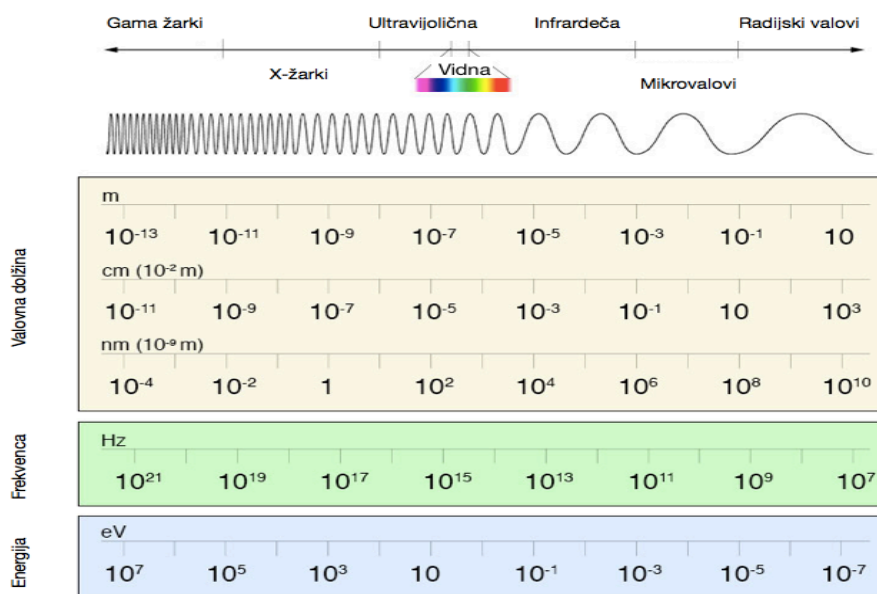
kjer je:

E Energija fotona (J)

$\nu$  Frekvenca (1/s)

h Planckova konstanta, ki je enaka  $6.62607004 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg / s}$ .

Učinki EMV na kemijske spojine in na biološke organizme so odvisni od energije valovanja in valovne dolžine ter segajo od segrevanja do ionizacije. Škodljive učinke tako določa frekvenca oziroma valovna dolžina EMV. V elektromagnetne spektru si sledijo od najmanjše do najvišje frekvence radijski valovi, mikrovalovi, infra rdeče sevanje, vidna svetloba, ultravijolična svetloba, X-žarki in gama žarki. EMV do ultravijolične svetlobe je neionirizajoče, saj je energija premajna za ionizacijo atomov in molekul. Na sliki 2-1 je prikazan celotni elektromagnetni spekter [6]

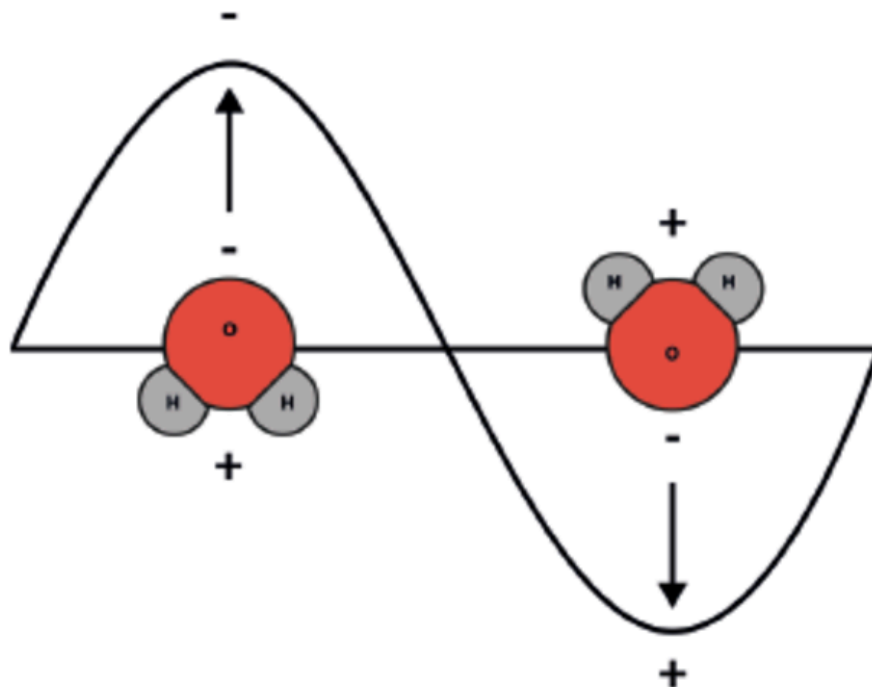


Slika 2-1 Elektromagnetni spekter

Mikrovalovi so del spektra z valovnimi dolžinami od 1mm do 1m, kar ustreza energiji od 1,24 meV do 1,24  $\mu$ eV. Potujejo v ravnih linijah, kar v normalnih vremenskih razmerah njihov doomet omejuje na od 50 km do 65 km vidnega horizonta. Absorbira jih vlaga v atmosferi, pri čemer je padec amplitude obratnosorazmeren frekvenci valovanja. Mikrovalove s frekvencami, višjimi od 40 GHz, absorbirajo atmosferski plini, kar zmanjša njihov doomet na nekaj kilometrov. [7]

Uporaba mikrovalov je zelo široka in sega od kuhinje do vesolja. Majhne valovne dolžine omogočajo izdelavo kompaktnih večsmernih anten. Zaradi tega se mikrovalovne frekvence uporabljajo za brezžične naprave, kot so mobilniki, WiFi usmerjevalniki in brezžične slušalke. Kratke valovne dolžine omogočajo oddajanje ozkih žarkov, ki se uporabljajo za radar in točkovno telekomunikacijo. Prednost takih žarkov je zmanjšanje interferenc okoliških naprav, kar omogoča večkanalno komunikacijo v ozkem frekvenčnem območju. [7]

Polarna topila absorbirajo mikrovalove na dva načina: z dipolno polarizacijo ter ionsko prevodnostjo. Pri prvem načinu se dipolni moment obrne v smeri spreminjajočega se električnega polja (EP), kar vodi do rotiranja vodnih molekul. Pri drugem načinu se solvativane ionske snovi premikajo v oscilirajočem EP, kar spet privede do rotacije vodnih molekul zaradi učinka rotacijske polarizacije in kinetične depolarizacije [5]. Na sliki 2-2 vidimo prikaz dipolne polarizacije vode.



Slika 2-2 Dipolarna polarizacija vode

## 2.2 Beta peptid

Beta peptidi so sestavljeni iz beta amino kislin, ki imajo amino skupino vezano na beta ogljik namesto na alfa ogljik. Edina pogosta naravna beta amino kislina je beta alanin. Uporabljajo se pri sintezi antibiotikov, saj je odpornost bakterij na te antibiotike manjša.

V alfa aminokislinah sta karboksilna in amino skupina vezani na isti ogljikov atom, imenovan alfa ogljik (ime izhaja iz oddaljenosti enega atoma od karboksilne skupine). V beta amino kislinah je amino skupina vezana na beta ogljik, ki je dva atoma oddaljen od karboksilne skupine.

Sinteza beta amino kislin je lahko zahtevna zaradi prisotnih funkcionalnih skupin in ohranitve kiralnosti. Beta alanin je akiralen, večina večjih amino kislin pa ima kiralen beta ogljik.

Obstajata dve glavni skupini beta peptidov: tisti, ki imajo organski ostanek ob aminu so imenovani beta 3 peptid. Tisti, ki ga imajo ob karbonilnem ogljiku, pa se imenujejo beta 2 peptidi.

Alkilni substituenti na alfa in beta položajih v beta amino kislini preferirajo gauche konformacijo pri vezi med alfa in beta ogljikom. O gauche konformaciji govorimo, ko imamo konformacijski izomer (konformer), kjer sta dve sosednji funkcionalni skupini zamaknjeni za torzijski kot  $60^\circ$ . To vpliva na termodinamsko stabilnost molekule. [8]

Izbira beta peptida ni bila naključna. Odsotnost kiralnega centra in majno število atomov v peptidu je omogočilo hitrejše simulacije. Spodaj na sliki 2-3 vidimo obravnavan peptid.



Slika 2-3 Beta peptid

## 2.3 Metode računalniške kemije

Računalniška kemija ali molekularno modeliranje je zbirka metod, ki se uporablja za raziskovanje kemijskih problemov na računalniku. Najpogostejše lastnosti, ki jih hočemo raziskati so:

- Molekularna geometrija: dolžine vezi, koti ter dihedralni koti.
- Energije molekul in njihovih prehodnih stanj: to nam pove, katera oblika je bolj obstojna v ravnotežju.
- Kemijska reaktivnost: lahko določimo, kje na molekuli je največja verjetnost reakcije.
- IR, UV in NMR spektri.
- Interakcije substratov z encimi.
- Fizikalne lastnosti snovi.

Pri raziskavi teh lastnosti se največkrat poslužimo molekulske mehanike (MM), MD in kvantno mehanskih (QM) metod kot so ab initio metode, semiempirične metode, teorije gostotnih funkcionalov (TGF oziroma DFT-Density functional theory).

MM obravnava atome in vezi kot krogle in vzmeti in ne upošteva prisotnost elektronov. Potencialno energijo molekule predstavlja seštevek prispevkov raztezanja vezi, dihedralnih kotov, nepravilnih dihedralnih kotov in nevezne energije (van der Waalove oz. VDW in elektrostatske oz. ES interakcije). Matematična formulacija teh količin nam da polje sil. Uporablja se za določitev energije in geometrije bioloških makromolekul. Izračuni niso zahtevni, kar omogoča preučevanje večjih sistemov. Uspešno se uporablja v farmacevtski industriji za razvoj novih zdravil.

Kvantna mehanika (QM) za razliko od MM upošteva elektrone. QM uči, da je energija kvantizirana, kar pomeni, da se oddaja in sprejema v diskretnih "paketih" z velikostjo, ki ustreza enačbi (2-1). Osnovana je na Schrödinger-jevi valovni funkciji, ki izhaja iz klasične valovne teorije in de Borglijevega postulata, da je vsak delec povezan z določeno valovno dolžino. Prednost je večja točnost rezultatov. Cena za to je daljši čas izračunov. Zaradi tega se uporablja za preučevanje manjših sistemov. Popularna je kombinacija obeh metod kjer za QM izračune uporabimo geometrijo določeno z MM. [8]

Ab initio metode in DFT omogočata proučevanje lastnosti molekul, ki niso prevelike. Semiempirične metode, ki so hitrejše od ab initio metod in DFT, se lahko uporabijo za večje molekule.

Pri izvajanju simulacij imamo na razpolago dva načina modeliranja prisotnega topila:

- eksplicitno
- implicitno.

Pri eksplicitnem načinu v simuliran sistem vstavimo molekule topila. Tak pristop najbolj natančno opiše vpliv topila na topljenec. Pomanjkljivost je veliko število atomov v sistemu, kar posledično vodi v daljše izračune. Zaradi tega smo pri izbiri eksplicitnega modeliranja omejeni na krajše simulacije in na manjše sisteme. Te pomanjkljivosti so vodile v razvoj implicitnih modelov, ki zajemajo vpliv topila na topljenec. Ni potrebna simulacija atomov topila, kar znatno skrajša čas izračunov in omogoči simulacije večjih makromolekul in daljše simulacijske čase. [9]

V našem primeru smo se odločili za eksplicitno modeliranje metanola, ker prikaže najbolj realen vpliv na beta peptid in simulacije niso bile preveč računsko zahtevne.

### 2.3.1 Molekulska mehanika (MM)

Molekulska mehanika (MM) je osnovana na modelu molekul, ki jih predstavljajo skupki kroglic (predstavljajo atome) povezanih z vzmetmi (predstavljajo vezi). V okvirju tega modela se energija molekule spremeni zaradi sprememb geometrije. Vzmeti se upirajo raztezanju in upogibanju iz njihove "naravne" lege, kroglice pa se upirajo približevanju med sabo.

Princip MM je izražanje energije molekul kot funkcije odpora proti raztezanju vezi, upogibanja vezi in približevanja atomov ter uporablja to enačbo energije za določitev dolžine vezi, kotov in dihedralnih kotov, ki ustrezajo geometriji z najnižjo energijo.

Zaradi zanemarjanja elektronov metoda ni uporabna za raziskovanje lastnosti kot so razporeditev naboja, nukleofilno ali elektrofilno obnašanje. MM implicitno uporablja Born-Oppenheimer aproksimacijo, kajti le če na jedra deluje skupno statično privlačna sila, bodisi od elektronov ali vzmeti, ima molekula določeno geometrijo.

Izračuni pri MM potekajo na osnovi polja sil, ki je sestavljeno iz empiričnih potencialnih funkcij, ki vsakemu delcu v sistemu priredi ustrezno potencialno energijo in pove kako se ta spreminja glede na spremembo položaja.

Potencialno energijo molekule lahko zapišemo z naslednjo enačbo.

$$E = \sum(E_{kov.vezi} + E_{kot\ vezi} + E_{dih.kot} + E_{nepravilen\ torzijski\ kot} + E_{nevezna}) \quad (2-2)$$

$$E_{nevezna} = E_{VDW} + E_{es} \quad (2-3)$$

Kjer je:

$E$	Clokupna potencialna energija molekule (kcal/mol)
$E_{kov.vezi}$	Potencialna energija kovalentne vezi (kcal/mol)
$E_{kot\ vezi}$	Potencialna energija valenčnega kota (kcal/mol)
$E_{dih.kot}$	Potencialna energija dihedralnega kota (kcal/mol)
$E_{nevezna}$	Nevezna potencialna energija (kcal/mol)
$E_{VDW}$	Potencialna energija van der Waalsovih interakcij (kcal/mol)
$E_{es}$	Potencialna energija elektrostatskih interakcij (kcal/mol)

Vsote so preko vseh vezi, A-B vseh valenčnih kotov definirane preko treh atomov A-B-C, vseh dihedralnih kotov definiranih s štirimi atomi A-B-C-D in neveznih interakcij med atomi sistema. Matematična oblika teh členov in parametrov določa polje sil.

Povečanje energije vzmeti je porproporcionalna eni polovici kvadrata raztezka. To zapišemo z enačbo

$$E_{kov.vez} = \frac{1}{2} K_l (l - l_0)^2 \quad (2-4)$$

kjer je:

$E_{kov.vez}$	Razlika v energiji vezi (kcal/mol)
$K_l$	Harmonska konstanta (kcal/mol m)
$l$	Trenutna lega (m)
$l_0$	Lega v ravnotežnem stanju(m)

Večji kot je raztezek, bolj se vzmet upira raztezkju.

Povišanje energije sistema kroglica-vzmet-kroglica-vzmet-kroglica, pripadajočega triatomski enoti A-B-C je približno proporcionalna polovici kvadrata povečanja kota. To zvezo vidimo v naslednji enačbi (2-5).

$$E_{val.kot} = \frac{1}{2} K_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 \quad (2-5)$$

kjer je:

- $K_{\theta}$     Harmonska konstanta (kcal/mol rad<sup>2</sup>)
- $\theta$       Trenutni valenčni kot (rad)
- $\theta_0$     Ravnotežni valenčni kot (rad)

Pri dihedralnem kotu imamo 4 zaporedno vezane atome A-B-C-D. Je kot med A-B vezjo in C-D vezjo, če gledamo vzporedno z B-C vezjo. Konvencionalnjo je ta kot pozitiven, če gre za rotacijo v smeri urinega kazalca. Enačba, ki opisuje ta prispevek k potencialni energiji, je sladeča (2-6).

$$\Delta E_{dih.kot} = \frac{1}{2} K [1 + \cos(nu - \gamma)] \quad (2-6)$$

kjer je:

- $K$         Amplituda (kcal/mol)
- $n$         Multipliciteta (/)
- $u$         Velikost dihedralnega kota (rad)
- $\gamma$        Fazni kot (rad)

Prispevek nepravih torzijskih kotov opiše podobna zveza kot za kote med vezmi. Gre za kot med dvema ravninama, ki sta definirani s po tremi nelinearnimi atomi.

$$\Delta E_{nep.tor.kot} = \frac{1}{2} K_{\varphi} (\varphi - \varphi_0)^2 \quad (2-7)$$

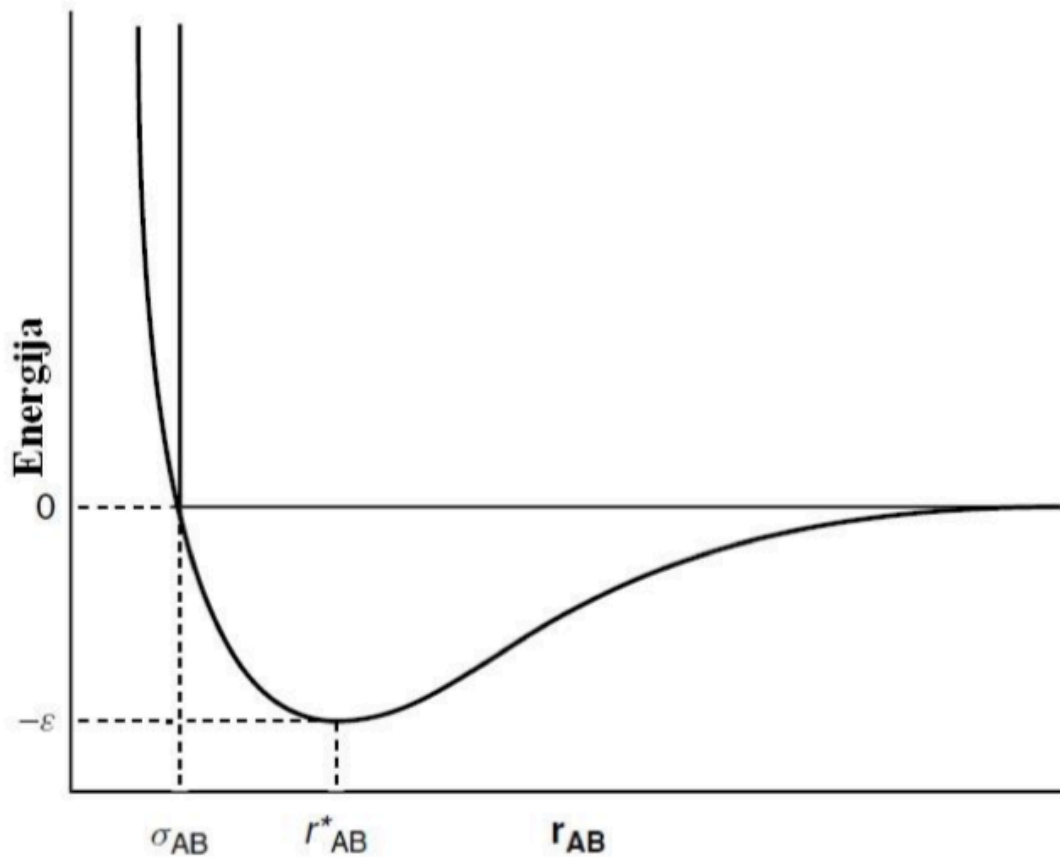
kjer je:

- $K_{\varphi}$     Harmonska konstanta za nepravi torzijski kot (kcal/mol rad)
- $\varphi$       Trenutni nepravi torzijski kot (rad)
- $\varphi_0$     Ravnotežni nepravi torzijski kot (rad)

Pri  $\pi$  konjugiranih sistemih je ravnotežni kot enak nič in lahko zapišemo

$$E_{nep.tor.kot} = \frac{1}{2} K_{\varphi} \varphi^2 \quad (2-8)$$

Člen neveznih interakcij predstavlja spremembo potencialne energije med atomoma, ki nista povezana neposredno s kovalentno vezjo. To so atomi, ki jih ločujeta vsaj dva atoma (A-X-Y-B) ali so celo del drugih molekul. Ta sprememba potencialnih energij je posledica delovanja van der Waalsovih in elektrostatskih sil. Do odkritja prvih je pripeljalo neidealno obnašanje žlahtnih plinov. Pri določenih pogojih se namreč tudi žlahtni plini utekočinijo, čeprav nimajo dipolnih momentov, ki bi poskrbeli za elektrostatsko privlačnost. To je pomenilo, da morajo obstajati še druge privlačne sile. Ta sila je proporcionalna z  $1/r^6$ . Ko to interakcijo združimo s Paulijevo odbojno silo, dobimo Lennard-Jones potencial. Pripadajoč graf vidimo na sliki 2-4 na naslednji strani.



Slika 2-4 Krivulja Lennard-Jones potenciala

Minimum potencialne energije določa globina potencialne jame  $\epsilon$ . V tej točki sta atoma na ravnovesni razdalji  $r_{AB}^*$ . Sigma predstavlja razdaljo pri kateri LJ potencial spremeni predznak. Te interakcije lahko zapišemo v obliki spodnje enačbe:

$$E_{w dv} = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (2-9)$$

Oziroma

$$E_{w dv} = \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} \quad (2-10)$$

kjer je:

$$A = 4\epsilon\sigma^{12}$$

$$B = 4\epsilon\sigma^6$$

$E_{w dv}$  Potencialna energija van der Walsovih sil (kcal/mol)

$\epsilon$  Globina potencialnega vodnjaka (kcal/mol)

$\sigma$  Razdalja trka (m)

Elektrostatski potencial opiše Coulombova zveza.

$$E_{es} = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}} \quad (2-11)$$

kjer je:

- $q_1$     Naboj prvega iona
- $q_2$     Naboj drugega iona
- $\epsilon_0$     Dielektrična konstanta
- $r_{12}$    Razdalja med ionoma



### 2.3.2 Molekularna dinamika

Pri molekularni dinamiki (MD), dobimo zaporedne konfiguracije z integracijo Newtonovih zakonov gibanja. Rezultat je trajektorija, ki beleži hitrosti in pozicije delcev skozi čas. Za to je potrebno rešiti spodnjo enačbo po vseh koordinatah za vse delce. To pomeni, da imamo 3 N enačb, pri čemer je N število delcev.

$$-\frac{dE}{dr} = m \left( \frac{d^2r}{dt^2} \right) \quad (2-12)$$

Oziroma

$$-\frac{dE}{dr} = \frac{dp}{dt} \quad (2-13)$$

kjer je:

$E$  Potencialna energija (kcal/mol)

$r$  Krajevni vektor (m)

$t$  Čas (s)

$p$  Gibalna količina (kg m/s)

Osnovna ideja je, da integracijo razdelimo na manjše korake, vse ločene za določen  $\Delta t$ . Celotna sila na delec je izračunana kot vektorska vsota vseh interakcij, ki vplivajo nanj. Iz dobljene sile lahko določimo pospešek delcev, kar nam v kombinaciji s pozicijami in hitrostmi pri času  $t$  da pozicije in hitrosti pri času  $t + \Delta t$ . Med časovnim korakom predpostavimo, da je sila konstantna.

Predpostavimo, da lahko pozicije in dinamične lastnosti v času  $t + \Delta t$  v približku opišemo s Taylorjevo vrsto.

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 a(t) + \frac{1}{6} \Delta t^3 b + \frac{1}{24} \Delta t^4 c(t) + \dots \quad (2-14)$$

$$v(t + \Delta t) = v(t) + \Delta t a(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 b(t) + \frac{1}{6} \Delta t^3 c(t) + \dots \quad (2-15)$$

$$a(t + \Delta t) = a(t) + \Delta t b(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 c(t) + \dots \quad (2-16)$$

kjer je:

$\Delta t$  Časovni korak (s)

$v$  Hitrost (m/s)

$a$  Pospešek (m/s<sup>2</sup>)

$b$  Odvod pospeška (m/s<sup>3</sup>)

Najbolj uporabljen je Verletov algoritem, ki uporabi za izračun novih pozicij pospeške in pozicije pri času  $t$  in pozicije prejšnjega časovnega koraka  $r(t - \Delta t)$ . Zapišemo lahko naslednji zvezi.

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 a(t) \quad (2-17)$$

$$r(t - \Delta t) = r(t) - \Delta t v(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 a(t) \quad (2-18)$$

Če ti enačbi seštejemo dobimo

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + \Delta t^2 a(t) \quad (2-19)$$

Ker se hitrosti ne pojavijo eksplicitno v Verletovem algoritmu, lahko uporabimo naslednje zveze

$$v(t) = \frac{[r(t + \Delta t) - r(t - \Delta t)]}{2\Delta t} \quad (2-20)$$

Ali z uporabo polovice časovnega koraka

$$v\left(t + \frac{1}{2} \Delta t\right) = \frac{[r(t + \Delta t) - r(t)]}{\Delta t} \quad (2-21)$$

Uporaba tega algoritma je računsko nezahtevna. Pomanjkljivost se pojavi zaradi prištevnja majhnega člana  $\Delta t a(t)$  k dvema veliko večjima členoma,  $2 r(t)$  in  $r(t - \Delta t)$ . To lahko vodi do zmanjšanja točnosti ob daljših simulacijah. [10]

## 2.4 Uporabljeni računalniški programi

Gromos je akronim za GRONigen Molecular Simulation computer program package in je program, ki ga razvijajo že od leta 1978 za dinamično modeliranje (bio)molekul. GROMOS se razvija že od začetnega GROMOS80; 25 let je namenjen za uporabo v univerzitetnem okolju. Njegova uporaba je za znanstvene namene, katere kategorizira spreminjajoč pritek uporabnikov, ki hočejo vključiti nove simulacijske algoritme ali uporabiti že obstoječe za raziskovanje polimerov, stekel, tekočih kristalov, kristalov in raztopin biomolekul. Za te namene je ustavrjen po določenih principih:

- transparentnost kode
- modularna arhitektura
- ločenost simulacijske kode in polja sil.

Namenjen je za simulacije MD in stohastične dinamike.

GROMOS je na začetku bil napisan v jeziku FORTRAN, ki ga je s časom nadomestil C++. To je vodilo do spemembe gonila za MD, ki vodi simulacije molekulske dinamike, stohastične dinamike in mimimizacije energije. Nastal je nov program MD ++. [4]

VMD se uporablja za modeliranje, prikazovanje in analizo biloških sistemov, kot so proteini in nukleinske kisline. Lahko se uporablja za analizo bolj splošnih molekul, saj lahko bere datoteke iz podatkovne baze proteinov (Protein Data Bank - PDB). Ponuja veliko možnosti za prikazovanje in urejanje molekul. Uporablja se za prikaz trajektorij in geometrij, ki jih dobimo pri simulacijah MD.

Za grafičen prikaz rezultatov smo uporabili program Xmgrace, ki je brezplačen program za risanje 2D grafov in deluje na operacijskih sistemih, ki so osnovani na Unix-u.

## 2.5 Analiza rezultatov MD simulacij

### 2.5.1 RMSD

RMSD (root mean square deviation) je pogosto uporabljen kot merilo razlike med trenutno in referenčno vrednostjo. Pri simulacijah MD se uporablja za primerjavo struktur biomolekul, kot so proteini. Tako lahko na primer primerjamo zvito in nezvito konformacijo proteina. Spodnja enačba prikazuje izračun RMSD.

$$RMSD = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(x_i^1 - x_i^0)^2 + (y_i^1 - y_i^0)^2 + (z_i^1 - z_i^0)^2}{N}} \quad (2-22)$$

kjer je:

$x_i^0, y_i^0, z_i^0$	Koordinate atomov referenčne strukture
$x_i^1, y_i^1, z_i^1$	Koordinate atomov trenutne strukture
$N$	Število atomov v molekuli

Pri popolnem ujemanju struktur je vrednost RMSD enaka 0.

### 2.5.2 RMSF

RMSF (root mean square fluctuation) nam pove, kako se povprečen RMSD atoma spreminja skozi čas. Toraj nam pove povprečno odstopanje od neke povprečne strukture. Večji je RMSF, večje so strukturne spremembe.

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{N_t} \sum_{i=1}^{N_t} (r - \langle r \rangle)^2} \quad (2-23)$$

kjer je:

$N_t$	Število časovnih korakov
$r$	Trenutna lega atoma
$\langle r \rangle$	Povprečna lega atoma

### 2.5.3 Rgyr

Rgyr je program, ki po celotni trajektoriji izračuna radij sukanja za izbran nabor atomov. Enačba, ki jo uporablja program je sledeča.

$$R_{gyr} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i - r_{com})^2} \quad (2-24)$$

kjer je:

$R_{gyr}$	Radij rotacije
$N$	Število izbranih atomov
$r_i$	Položaj $i$ -tega atoma
$r_{com}$	Položaj masnega središča

Ob upoštevanju mas atomov lahko zapišemo naslednjo enačbo.

$$R_{gyr} = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i (r_i - r_{com})^2} \quad (2-25)$$

kjer je:

$M$	masa vseh izbranih atomov
$m_i$	masa $i$ -tega atoma

### 2.5.4 Tser

Program tser lahko iz datotek trajektorije določi strukturne lastnosti raziskovane molekule po celotnem času in določi njihovo razporeditev. Lastnost, ki jo hočemo proučevati določimo z argumentom @prop v arg datoteki. Izbiramo lahko med naslednjimi lastnostmi:

- Razdalja (d)
- Kot (a)
- Strig (t)
- Periodični strig (pt)
- Vodikova vez (hb)
- Zvijanje (st)
- Red (o)
- Parameter reda (op)
- Psevdo rotacija (pr)
- Amplitude gubanja (pa)

Črke v oklepajih predstavljajo kratice, ki jih vnesemo v .arg datoteko pod argument @prop. V našem primeru smo računali razdaljo med začetnim in končnim fragmentom betapeptida.

### 2.5.5 Hbond

Program hbond beleži pojav vodikovih vezi po celotni trajektoriji molekule. Obstoj vodikove vezi se zabeleži le, če sta izpolnjena naslednja pogoja:

- Razdalja med vodikovim atomom, H, ki je vezan na donorja, D, in akceptorjem A mora biti krajša od določene dolžine (ponavadi 0,25 nm)
- Kot med D-H-A mora biti večji od določene vrednosti (ponavadi 135 °)

Uporabnik lahko določi dve skupini atomov (A in B) med katerima se beleži pojav vodikovih vezi. Če donorji in akceptorji niso eksplicitno določeni, se lahko določijo glede na njihovo maso zabeleženo v datoteki "massfile". Ob uporabi referenčne strukture se beležijo samo vodikove vezi, ki nastanjo z vodki pristonimi v tej strukturi.

### 2.5.6 Analiza klastrov

Analiza klastrov je pripomoček za obdelovanje podatkov, ki razdeli podatke v določene skupine oziroma klastre, ki si delijo podobne lastnosti. V optimalnem primeru mora biti podobnost med člani istega klastra večja kot podobnost članov različnih klastrov.

Pri simulacijah MD se ta metoda uporablja za združevanje podobnih molekularskih konformacij. Tako lahko ugotovimo najpogostejše konformacije preiskovane molekule. Določevanje klastrov je osnovano na RMSD izračunih. Referenčno strukturo nam ponavadi predstavlja eksperimentalno dobljena struktura iz NMR ali XRD analiz.

### 3 Eksperimentalni del

Ker smo pri diplomski nalogi ubrali računalniški pristop, se eksperimentalni del ni odvijal v laboratoriju ampak v virtualnem okolju. Naš cilj je bil, da s pomočjo programa za biomolekularne simulacije GROMOS ugotovimo vplive mikrovalov na zvijanje beta peptide. V ta namen smo uporabili dva različna temperaturna termostata, ki ločeno nadzorujeta rotacijsko in translacijsko temperaturo. Uporaba ločenih termostatov nam je omogočila simulacijo mikrovalov. Izvedli smo dve seriji simulacij, ki so potekale pri 300 K, 400 K, 500 K, 600 K. Eno serijo smo izvajali samo pri povišani rotacijski temperaturi drugo pa pri povišani rotacijski in translacijski temperaturi. Tako smo simulirali in primerjali vplive segrevanja z mikrovalovi in klasičnega segrevanja na strukturne lastnosti beta peptide. Vse simulacije so trajale 200 ns.

#### 3.1 Računalniška oprema

Za izvedbo simulacij smo uporabili delovne postaje računalniške gruče na univerzi Maribor. Od celotne gruče smo uporabili dve, ki sta opremljeni s po dvema Xeon E5 2630- v4 procesorjema, kar skupaj nanese 20 jeder, 32 GB delovnega pomnilnika in grafično kartico GeForce GTX 1050Ti. Izvedba je potekala na operacijskem sistemu XUbuntu Linux. Pri izvajanju simulacij pridemo v stik z naslednjimi vrstami datotek:

- .top – vsebuje podatke od topologiji molekule
- .pdb - vsebuje podatke o koordinatah in lastnostih atomov, ki sestavljajo molekulo ter omogoča vizualni prikaz v programu VMD
- .dat – vsebuje podatke o koordinatah
- .out – vsebuje rezultate energijske analize oziroma kratek povzetek analize
- .pdf – vsebuje grafičen prikaz rezultatov
- .arg – vsebuje navodila za izvajanje simulacij in analiznih programov

### 3.2 Topologija molekule beta peptida

Za uspešno izvajanje simulacij smo najprej morali izdelati datoteko, ki vsebuje podatke o topologiji molekule. V tej datoteki najdemo informacije, ki opišejo strukturo molekule v mejah tridimenzionalnega prostora. Slika 3-1 prikazuje primer datoteke s topologijo

```
TITLE
MAKE_TOP topology, using:
53a6.mtb
53a6_beta.mtb
53a6.ifp
Force-field code: 53A6
CON_TOP parameters: /home/common/gromos_20160524/forcefields/official/43a1.ifp
renumbering from: ren53a5_to_45a4.dat
END
PHYSICALCONSTANTS
# FPEPSI: 1.0/(4.0*PI*EPS0) (EPS0 is the permittivity of vacuum)
138.9354
# HBAR: Planck's constant HBAR = H/(2* PI)
0.0635078
# SPDL: Speed of light (nm/ps)
299792.458
# BOLTZ: Boltzmann's constant kB
0.00831441
END
TOPVERSION
2.0
END
ATOMTYPENAME
# NRATT: number of van der Waals atom types
43
# TYPE: atom type names
O
OM
OA
OW
N
NT|
NL
NR
NZ
NE
# 10
C
CH1
CH2
CH3
CH4
CR1
HC
H
DUM
S
.
.
.
```

Slika 3-1 Datoteka topologije



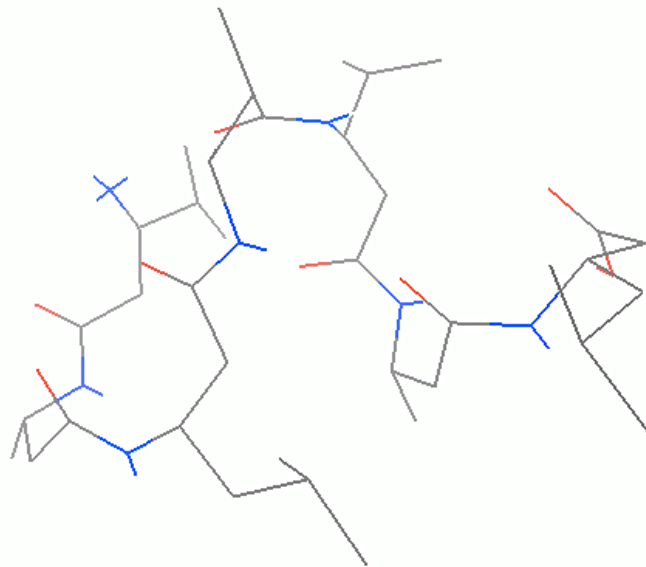
### 3.3 Energijska minimizacija beta peptida

Pred začetkom simulacij smo izvedli začetno termalizacijo in ekvibracijo sistema. To smo storili, da se je postopoma relaksirala začetna geometrija peptida in metanola. V ta namen smo izvedli 0,1 ns dolge simulacije pri naslednjih temperaturah:

- 300 K
- 400 K
- 500 K
- 600 K

Sistem smo najprej simulirali v vakuumu, nato dodali topilo pri 50 K. Sledilo je povečevanje temperature v korakih po 50 K.

Dobljene podatke smo nato uporabili za nadaljnje simulacije klasičnega ter mikrovalovnega segrevanja. Simulacije so potekale 200 ns. Na sliki 3-2 vidimo beta peptid po ekvibraciji in termalizaciji.



Slika 3-2 Beta peptid po termalizaciji in ekvibraciji

### 3.4 Molekulska dinamika beta peptida

Za uspešno izvedbo simulacije molekulske dinamike smo morali pripraviti tri datoteke. V datoteki `.lib` smo definirali predloge, ki jih program **mkscript** uporablja za ustvarjanje in branje datotek. Predloga je posplošeno besedilo, kjer je del besedila obravnavan kot spremenljivka. To nam omogoča enotno in konstantno poimenovanje datotek, ki so generirane pri izvajanju simulacije.

V `.arg` datoteki smo določili ime simulacije in mesto zapisa podatkov ter datotečno pot do termalizirane in minimalizirane strukture betaptida, ki se v primeru za 400 K nahaja v datoteki `t400K_cv_01ns`. Z ukazom `@script` smo določili časovni korak 1 ns in število časovnih korakov 200, kar nam da 200 ns dolgo simulacijo. Vsebina te datoteke je prikazana na sliki 3-3.

```
@sys      md_peptide_ch3oh_sepT
@bin      /usr/local/bin/md++/bin/md
@dir      /home/simonk/simulacije/t400_cv_200ns
@files
  topo    ../topologija.top
  input   md.imd
  coord   ../t400_cv_1ns/md_peptide_ch3oh_sepT_1.cnf
@template gcc_omp.lib
@version  md++
@script   1 200
```

Slika 3-3 `.arg` datoteka za rotacijsko temperaturo 400 K

V .imd datoteki smo določili vse potrebne parametre za izvajenje simulacij molekulske dinamike. V vseh simulacijah smo v bloku SYSTEM nastavili, da je število molekul beta peptida 1 in število molekul metanola, ki deluje kot topilo, enako 1149. V bloku MULTIBATH temperaturnem bloku smo določali temperature različnih termostatov. Tako smo na primer za simulacijo obsevanja z mikrovalovi pri 400 K nastavili termostat za rotacijsko temperaturo na 400 K, termostat za translacijsko in vibracijsko temperaturo pa 300K. Povišana rotacijska temperatura topila nam da efekt obsevanja z mikrovalovi. [5] Pri simulacijah klasičnega segrevanja je bila temperatura vseh termostatov enaka. Vsebina .imd datoteke je prikazana na sliki 3-4.

```

TITLE
equilibration of the peptide in water
END
# we have 1 solute and 1181 solvent molecules
SYSTEM
#  NPM  NSM
   1  1149
END
# most of this block is overwritten by mkscript.
INITIALISE
#  NTIVEL  NTISHK  NTINHT  NTINHB  NTISHI  NTIRTC  NTICOM  NTISTI  IG  TEMPI
   0    0    0    0    0    0    0    0  123456  0.0
END
# do 50000 steps
STEP
#  NSTLIM  T  DT
   500000  0.0  0.002
END
# do it with rectangular periodic boundary conditions|
BOUNDCOND
#  NTB  NDFMIN
   1    3
END
# couple the temperature, the temperatures are overwritten by mkscript.
MULTIBATH
# ALGORITHM:
#  weak-coupling(0):  use weak-coupling scheme
#  nose-hoover(1):   use Nose Hoover scheme
#  nose-hoover-chains(2): use Nose Hoover chains scheme
# NUM: number of chains in Nose Hoover chains scheme
#  !! only specify NUM when needed !!
# NBATHS: number of temperature baths to couple to
#  ALGORITHM
   0
# NBATHS
   3
# TEMPO(1 ... NBATHS)  TAU(1 ... NBATHS)
   300                0.01
   300                0.01
   400                0.01
# DOFSET: number of distinguishable sets of d.o.f.
   2
# LAST(1 ... DOFSET)  COMBATH(1 ... DOFSET)  IRBATH(1 ... DOFSET)
   64                1                1
   3511              2                3
END
#PRESSURESCALE
.
.
.

```

Slika 3-4 .imd datoteka za rotacijsko temperaturo 400 K

Datoteke .imd, .lib in .arg smo pripravili za vse simulacije in vnesli v program **mk\_skript**, ki generira vhodne datoteke .run, .omd, .imd, .cnf, potrebne za izvajanje simulacij. Potem smo še sami preverili ustreznost vhodnih podatkov in z ukazom ./md\_peptide\_ch3oh\_sepT\_1.run zagnali simulacijo. Izvajanje simulacij je potekalo na delovnih postajah računalniške gruče. Vsaki simulaciji smo dodelili po 3 jedra, tako da so na vsaki postaji potekale tri vzporedne simulacije. Čas izvajanja ene simulacije je bil približno 10 dni.

### 3.5 Analiza trajektorij

Po končanih simulacijah smo analizirali trajektorije koordinat in energij. Za namen analize trajektorij smo kreirali direktorij ana. Ta je vseboval sistem map cluster, ene\_ana, frameout, hbond, rmsd, rmsf, rgyr, tser, tstrip. Imena map se skladajo z imeni analiz, ki smo jih izvajali.

Za energijsko analizo trajektorije smo najprej v datoteki ene\_ana.arg pod argument @prop določili katere lastnosti hočemo analizirati. V našem primeru so nas najbolj zanimale celokupna energija, potencialna energija, kinetična energija, VDW interakcije, ES interakcije in podatki o temperaturah. Določili smo datotečno pot do topologije našega betapeptida pod argument @topo in energijske trajektorije pod @en\_files. Na sliki 3-5 vidimo prikaze ene\_ana.arg datoteke.

```
@prop totene totpot totkin irtemp3 mttemp3 solutemp3 pressu e_pp e_ps e_pmean e_pp_vdw
e_pp_es e_ps_vdw e_ps_es
@topo ../../topologija.top
@library ene_ana.lib
@en_files

../../md_peptide_ch3oh_sepT_1.tre.gz
../../md_peptide_ch3oh_sepT_2.tre.gz
../../md_peptide_ch3oh_sepT_3.tre.gz
../../md_peptide_ch3oh_sepT_4.tre.gz
../../md_peptide_ch3oh_sepT_5.tre.gz
|
:
.
```

Slika 3-5 .arg datoteka za energijsko analizo

Ker smo preiskovali vplive mikrovalov na zvijanje betapeptida, smo analizirali vrednosti RMSD, ki nam povejo odstopanje od izbrane referenčne strukture. V našem primeru je bila referenčna struktura beta peptide določena z NMR analizo. Ker sta prvi in zadnji aminokislinski ostanek bolj gibljiva od ostalih smo izvajali dve analizi. Prva je upoštevala vse, druga pa le atome od drugega do predzadnjega aminokislinskega ostanka. Tako smo lahko videli vpliv gibljivosti končnih fragmentov na vrednosti RMSD. Zaradi tega smo pripravili dve .arg datoteki. Pod argument @atomrmsd smo določili atome, ki so bili upoštevani pri analizi. Z @ref smo določili pot do referenčne strukture in z @traj pot do podatkov o trajektoriji. Za hitrejši potek analiz smo s pomočjo programa tstrip iz sistema odstranili molekule topila. Na slikah 3-6 in 3-7 vidimo obe arg datoteki.

```
@topo ../../topologija.top
@pbc r
@atomrmsd 1:res(1-7:CB,CA,N,C)
@ref ../../nmr_struktura.cnf
@traj ../tstrip/solute.trc.gz
```

Slika 3-6 .arg datoteka za rmsd, ki upošteva vse aminokislinske ostanke

```
@topo ../../topologija.top
@pbc r
@atomsrmsd 1:res(2-6:CB,CA,N,C)
@ref ../../nmr_struktura.cnf
@traj ../tstrip/solute.trc.gz
```

Slika 3-7 .arg datoteka, ki upošteva le aminokislinske ostanke od drugega do predzadnjega

Sledila je analiza RMSF, s katero analiziramo fluktuacije pozicij atomov okoli referenčne pozicije. Postopek je bil podoben kot pri RMSD analizi le, da smo v .arg datoteki dodali argument @atomsfit, ki nam določi referenčno strukturo za izračun RMSF. Argumente vidimo na sliki 3-8.

```
@topo ../../topologija.top
@pbc r
@atomsfit 1:res(2-6:CB,CA,N,C)
@atomsrmsf 1:res(1-7:CB,CA,N,C)
@ref ../../nmr_struktura.cnf
@traj ../tstrip/solute.trc.gz
```

Slika 3-8 arg. datoteka za RMFS analizo

Program **frameout** nam je omogočil, da smo dobljene .cnf datoteke pretvorili v PDB format. Te datoteke nato lahko odpremo v programu VMD, s katerim lahko vizualno analiziramo trajektorije. Tako smo dobili animacije naših 200 ns dolgih simulacij. V frameout.arg smo spet določili podatkovne poti do potrebnih vhodnih podatkov in pri argumentu @outformat določili format PDB. Pripadajoča vsebina .arg datoteke je prikazana spodaj na sliki 3-9.

```
@topo ../../topologija.top
@pbc r cog
@outformat pdb
@spec EVERY
@frames 1000
@traj ../tstrip/solute.trc.gz
@single
@notimeblock
@ref ../../nmr_struktura.cnf
@atomsfit 1:res(2-6:CB,CA,N,C)
```

Slika 3-9 Pretvorba trajektorije v format PDB za analizo s programom VMD

Program **tser** nam omogoča pregled nad spreminjanjem geometrije skozi čas. V našem primeru smo spremljali, kako se je spreminjala razdalja od začetka do koca peptidne verige, se pravi od glave do repa. Za zagon programa smo v datoteki `tser.arg` določili datotečne poti do vhodnih podatkov in pod argument `@prop` določili, katere lastnosti hočemo analizirati; Oznaka `d%1:3,61` pomeni, da spremljamo razdaljo med atomoma z indeksom 3 in 61 na molekuli 1, kar ustreza razdalji med prvim N atom in zadnjim C atomom na glavni verigi.

```
@topo ../.././topologija.top
@pbc r
# 1N - 7C distance
@prop d%1:3,61
@traj ../tstrip/solute.trc.gz
```

Slika 3-10 Primer `.arg` datoteke za `tser` program

S programom **hbond** lahko analiziramo prisotne vodikove vezi v sistemu. Ker so vodikove vezi med atomi glavne verige odgovorne za sekundarno strukturo proteinov in peptidov, smo se osredotočili na analizo le teh. To smo določili z argumenti `@AcceptorAtomsA`, `@AcceptorAtomsB`, `@DonorAtomsA` in `@DonorAtomsB` kjer smo v vseh primerih uporabili vse atome peptida (`1:a`, kar pomeni prva molekula vsi atomi). Novi argumenti, ki se še pojavijo v datoteki `hbond_peptide.arg` so `@Hbparas`, ki določa največjo razdaljo in najmanjši kot med atomoma vodikove vez ter `@massfile`, ki poda mase akceptorjev in donorjev. Primer vsebine `.arg` datoteke je prikazan na sliki 3-11.

```
@topo ../.././topologija.top
@pbc r
@Hbparas 0.25 135
@massfile mass.file
@AcceptorAtomsA 1:a
@AcceptorAtomsB 1:a
@DonorAtomsA 1:a
@DonorAtomsB 1:a
@traj ../tstrip/solute.trc.gz
|
```

Slika 3-11 Primer `.arg` datoteke za analizo vodikovih vezi

Pri analizi gruče podobnih struktur smo najprej morali zagnati program **rmsdmat**, ki izračuna matriko RMSD vrednosti med vsemi pari struktur trajektorj. V .arg datoteki smo določili že prej omenjene argumente, ki definirajo datotečne poti do vhodnih podatkov. Z argumentom `@stride 20` smo določili, da se analiza izvede vsakih 20 časovnih korakov in z `@precision` smo določili število decimalnih mest rezultatov. Kot rezultat smo dobili datoteko RMSDMAT.dat, ki je vhodna datoteka za analizo gruče. Pripadajoča vsebina .arg datoteke je prikazana na Sliki 3-12.

```
@topo ../../topologija.top
@pbc r
@atomsfit 1:res(2-6:CB,CA,N,C)
@ref ../../nmr_struktura.cnf
@stride 20
@precision 4
@traj ../tstrip/solute.trc.gz
```

Slika 3-12 Primer .arg datoteke za program rmsdmat

V datoteki cluster.arg smo z argumentom `@cutoff` določili maksimalno vrednost RMSD, da struktura še spada v isto gručo. Z argumentom `@time` smo določili začetni čas in dolžino časovnega koraka vsebovanega v RMSD matriki iz RMSDMAT.dat. Ker smo uporabili referenčno NMR strukturo je argument `@force` enak 0. Parametri so prikazani na Sliki 3-13.

```
@precision 4
@cutoff 0.1
@force 0
@time 0 10
@rmsdmat RMSDMAT.bin|
```

Slika 3-13 Primer .arg datoteke za analizo clustrov

Sledila je analiza življenjskih dob posameznih gruč s programom **postcluster**. Za izvedbo smo morali v datoteki postcluster\_20.arg z argumentom `@lifetime` določiti minimalno število zaporednih struktur, ki se znatno razlikujejo od struktur analiziranega klastra. V našem primeru je to bilo 2, kar pomeni, da sta potrebni dve različni zaporedni strukturi za prehod v nov klaster. Na Sliki 3-14 je prikazan primer postcluster\_20.arg datoteke.

```
topo ../../topologija.top
@cluster_struct cluster_structures.dat
@cluster_ts cluster_ts.dat
@lifetime 2
@traj ../tstrip/solute.trc.gz|
```

Slika 3-14 Primer .arg datoteke za postcluster analizo



## 4 Rezultati in diskusija

### 4.1 Rezultati RMSD analize

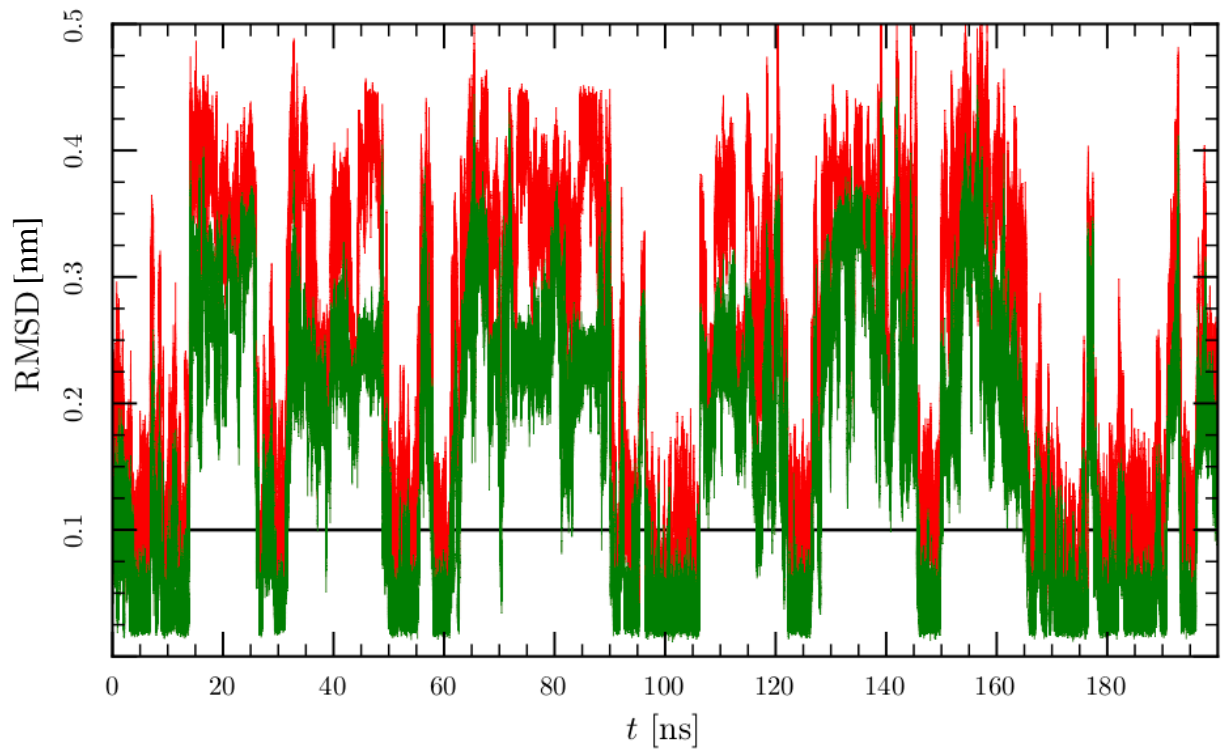
Ker nas je zanimal vpliv mikrovalov na zvijanje betapeptida, smo primerjali povprečne RMSD vrednosti in vpliv gibljivosti končnih fragmentov verige na njih. Kot smo pričakovali, so RMSD vrednosti za simulacije mikrovalov bile manjše napram klasičnem segrevanju, kar se ujema z rezultati hipotez. Manjše vrednosti pomenijo, da so pozicije atomov vijačnice manj razlikujejo od referenčne strukture kot pri klasičnem segrevanju. Ob upoštevanju prvega in zadnjega fragmenta vijačnice so se zaradi večje gibljivosti koncev verige RMSD vrednosti povečale, vendar je trend v primerjavi s klasičnim segrevanjem ostal.

Izračunali smo delež časa, ki ga molekula preživi v zvitih konformacijah, ki imajo RMSD vrednosti manjše od 0,1 nm. Razen pri rotacijski temperaturi 500 K je bil peptid v vseh primerih mikrovalovnega segrevanja več kot 30% časa v zvitih konformacijah. Pri klasičnem segrevanju že pri 400 K ta delež pade pod 10%. Z višanjem temperature ta delež dodatno pada. Povprečne vrednosti RMSD vidimo v spodnji tabeli.

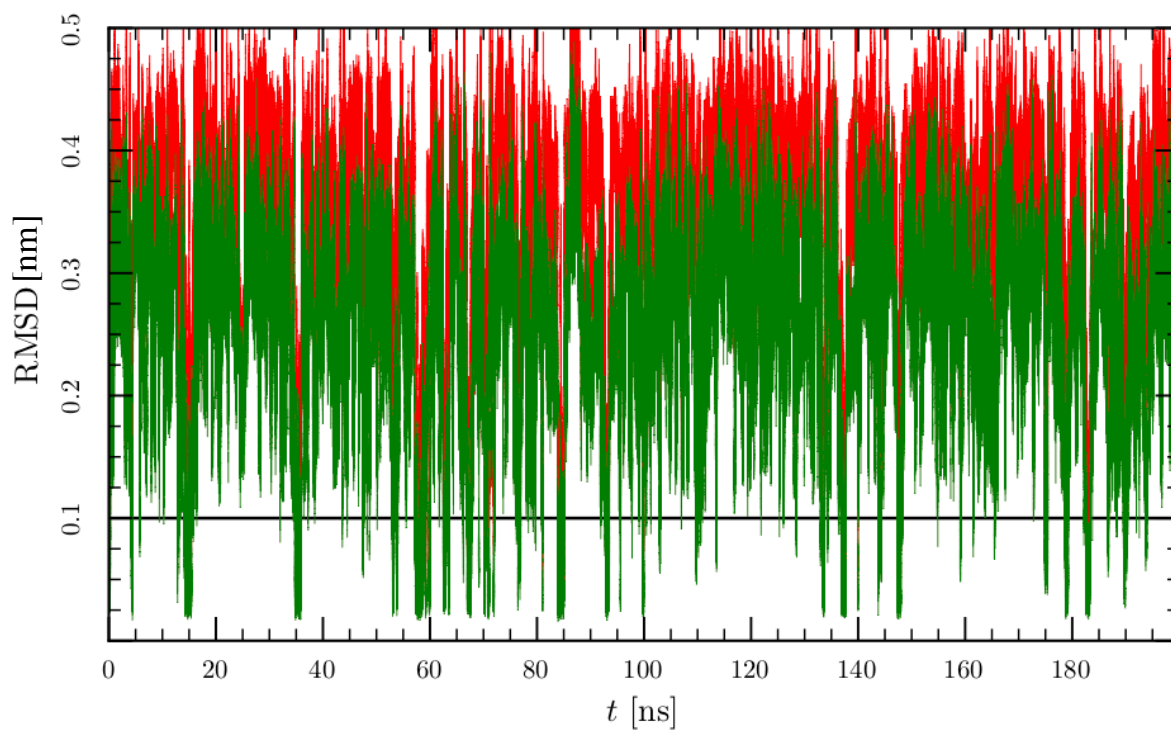
Tabela 4-1: Rezultati RMSD analize.

	T [K]	% zvitih struktur (RMSD < 0.1)	RMSD (res. 2-6) [nm]		RMSD (res. 1-7) [nm]	
			Povprečje	Standardna deviacija	Povprečje	Standardna deviacija
<b>Referenca</b>	300	36,10	0,24	0,12	0,24	0,12
<b>Mikrovalovi</b>	400	39,40	0,16	0,11	0,24	0,12
	500	16,50	0,21	0,09	0,30	0,11
	600	33,50	0,18	0,12	0,26	0,13
<b>Klasično segrevanje</b>	400	6,70	0,25	0,08	0,34	0,08
	500	0,40	0,32	0,05	0,39	0,05
	600	0,50	0,30	0,06	0,38	0,06

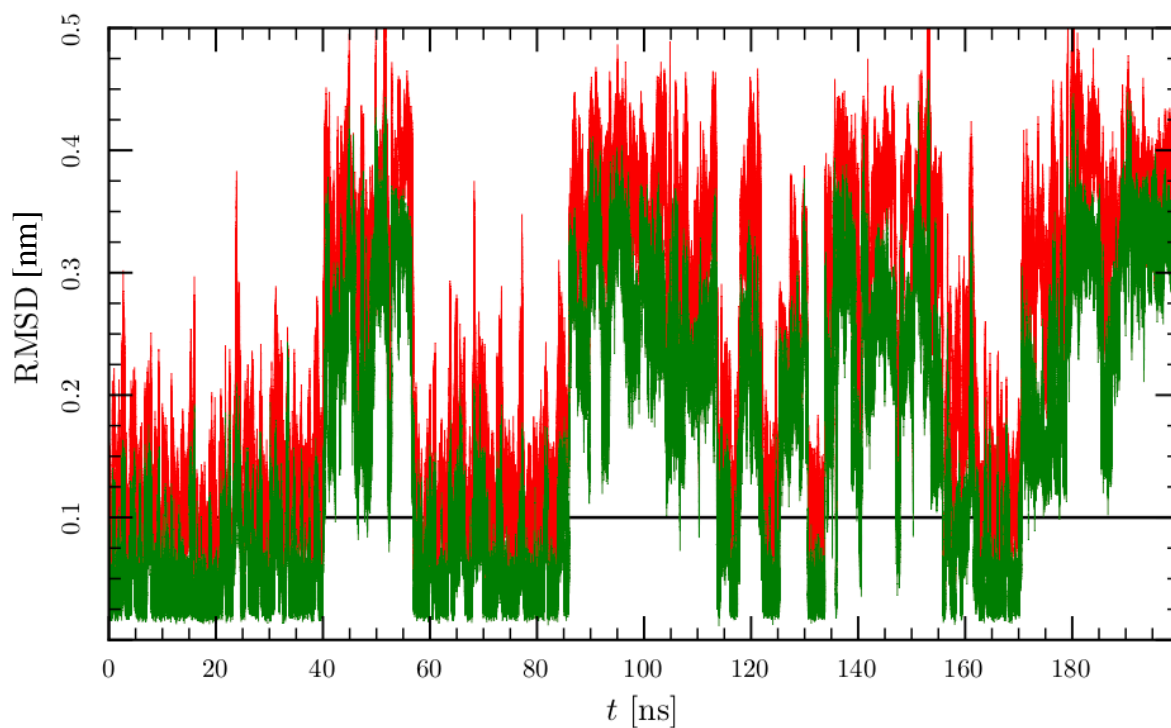
Časovne odvisnosti RMSD vrednosti posameznih simulacij so prikazane na slikah 4-1 - 4-5. Zelena barva prikazuje rezultate analize kjer nismo upoštevali terminalnih fragmentov, rdeča pa rezultate kjer smo upoštevali vse fragmente.



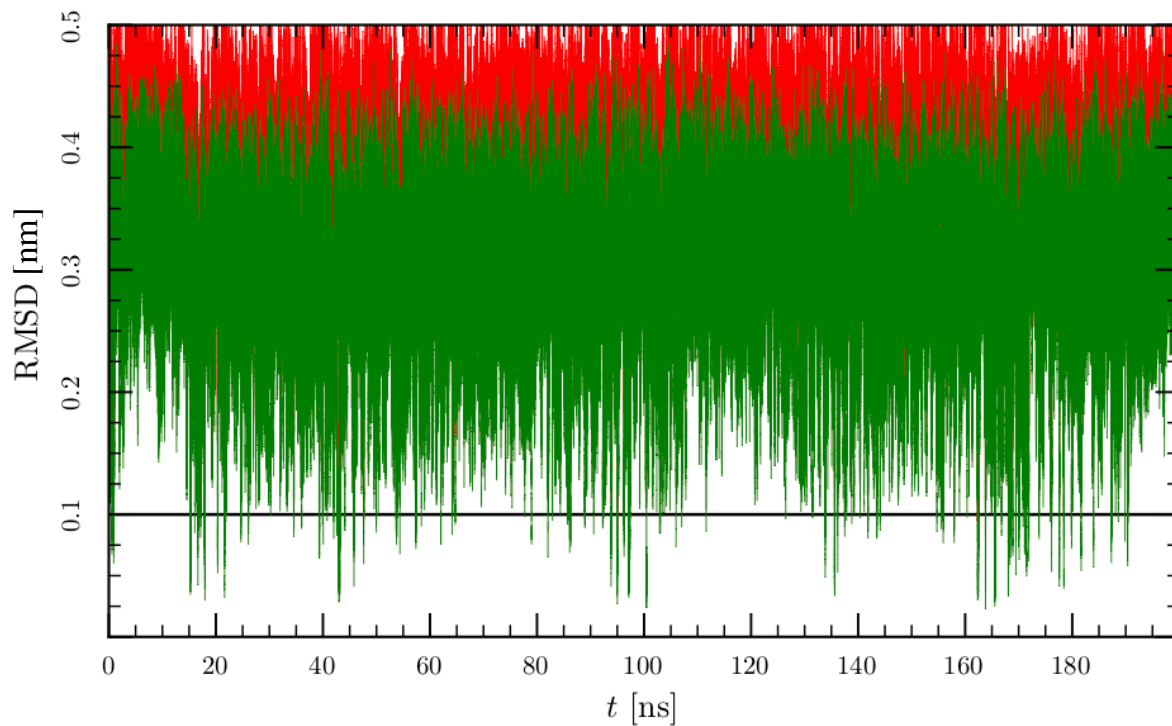
Slika 4-1 RMSD vrednosti za simulacijo sistema pri 300 K



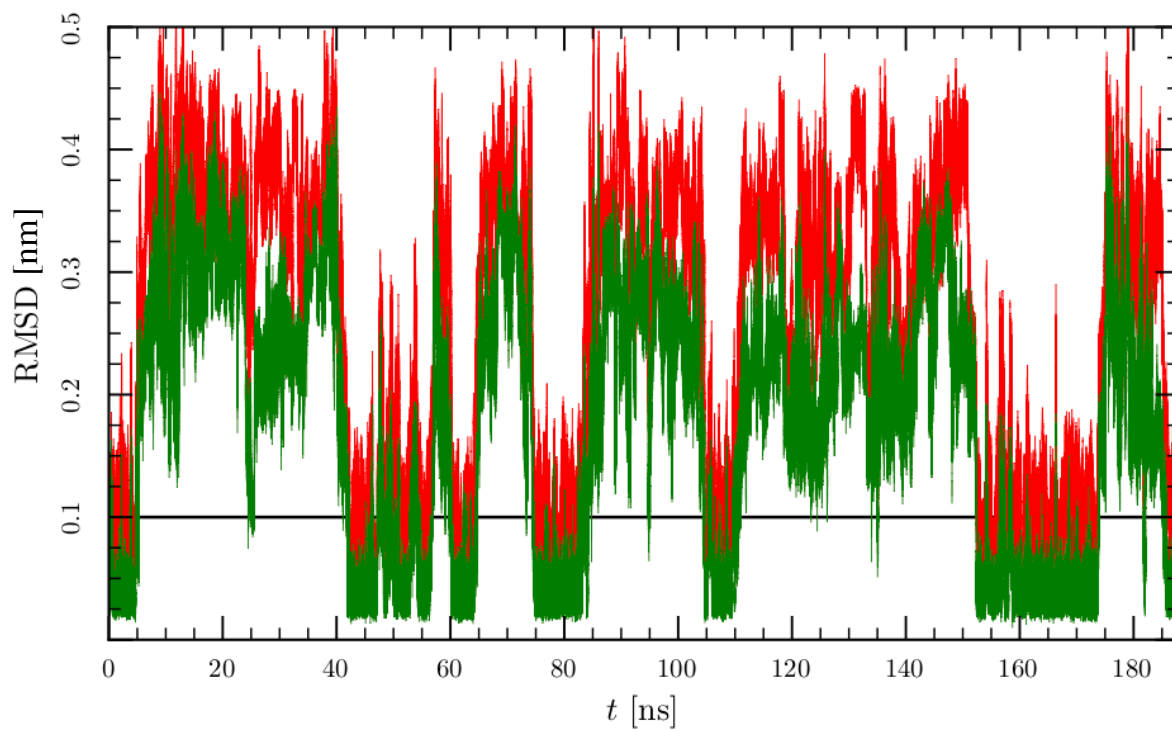
Slika 4-2 RMSD vrednosti za simulacijo klasičnega segrevanja pri 400 K



Slika 4-3 RMSD vrednosti za simulacijo mikrovalovnega segrevanja pri 400 K



Slika 4-4 RMSD vrednosti za simulacijo klasičnega segrevanja pri 600 K



Slika 4-5 RMSD vrednosti za simulacijo mikrovalovnega segrevanja pri 600 K

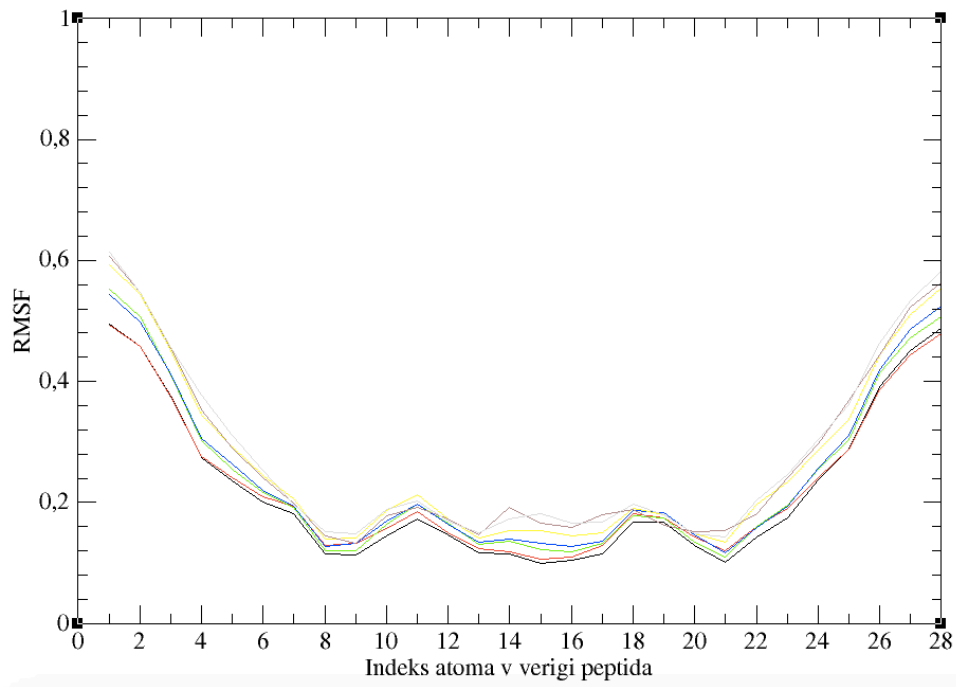
## 4.2 Rezultati RMSF analize

Rezultate RMSD analize smo dopolnili z RMSF analizo, ki nam je povedala kako RMSD vrednosti odstopajo od povprečne RMSD vrednosti atomov čez čas simulacije. Pri teh rezultatih ni tako velikih razlik med klasičnim in mikrovalovnim segrevanjem v vrednostih, se je pa ohranil trend, ki kaže na manjše fluktuacije in bolj zvito strukturo betapeptida pod vplivom mikrovalov. Rezultati so prikazani v spodnji tabeli 4-2.

Tabela 4-2: Rezultati RMSF analize.

	T [K]	RMSF (vijačnica) [nm]	
		Povprečje	Standardna deviacija
<b>Referenca</b>	300	0,22	0,13
<b>Mikrovalovno segrevanje</b>	400	0,23	0,12
	500	0,24	0,14
	600	0,25	0,13
<b>Klasično segrevanje</b>	400	0,27	0,14
	500	0,27	0,15
	600	0,28	0,15

Slika 4-6 na naslednji strani prikazuje rezultate RMSF analize za klasično in mikrovalovno segrevanje pri 300 K, 400 K, 500 K in 600 K. Črna črta predstavlja referenčni primer pri 300 K, rdeča mikrovalovno segrevanje pri 400 K, zelena mikrovalovno segrevanje pri 500 K in modra mikrovalovno segrevanje pri 600 K. Rumena črta predstavlja klasično segrevanje pri 400 K, vijolična klasično segrevanje pri 500 K in siva pri 600 K.



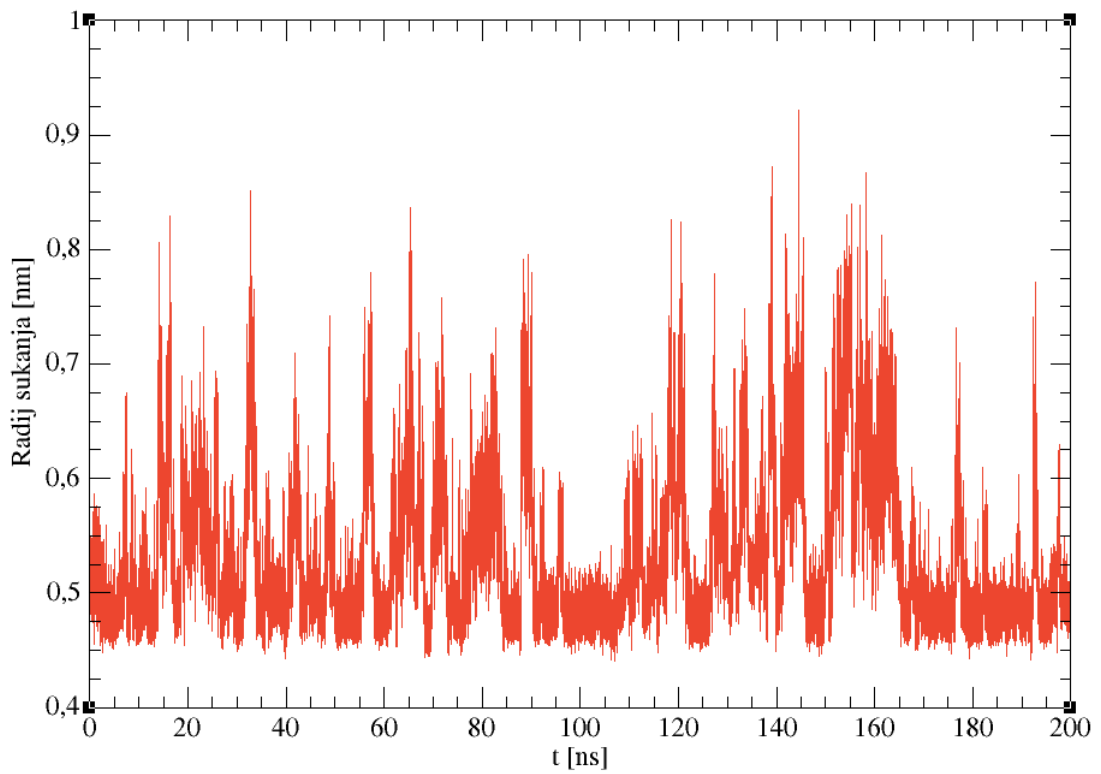
Slika 4-6 Grafičen prikaz razultatov RMSF analize

### 4.3 Rezultati rgyr analize

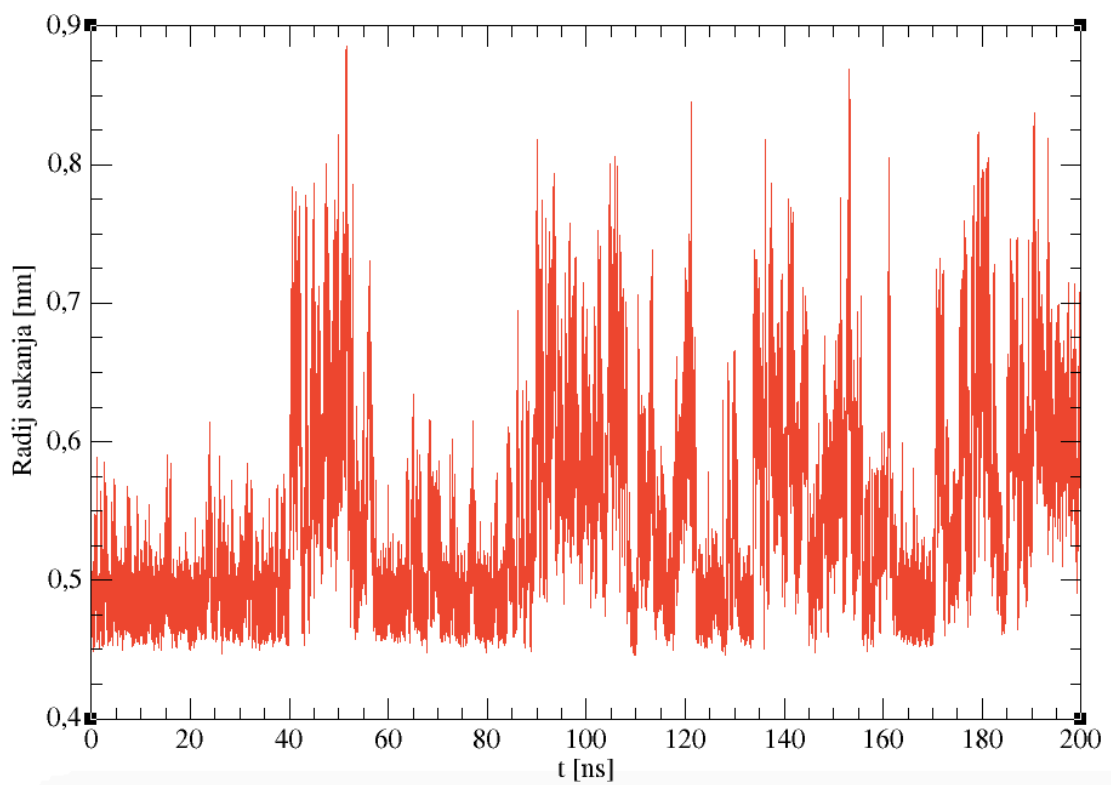
Primerjava rezultatov za radij sukanja, med klasičnim in mikrovalovnim segrevanjem kaže na manjši radij sukanja pri mikrovalovnem segrevanju. Radij sukanja se pri mikrovalovnem segrevanju ne spreminja drastično, med tem ko pri klasičnem segrevanju radij sukanja z višanjem temperature narašča. To se sklada s hipotezo, da mikrovalovi vodijo v kompaktnejše konformacije beta peptidov in v razvitje pri klasičnem segrevanju. Povprečne vrednosti radija sukanja vidimo v Tabeli 4-3. Na slikah 4-7 - 4-11 vidimo primere grafov za mikrovalovno in klasično segrevanje pri 300 K, 400 K in 600 K.

Tabela 4-3 Rezultati analize radija sukanja

	T[K]	Povprečna vrednost rgyr [nm]	Sandardna deviacija [nm]
Referenca	300	0,53	0,06
Mikrovalovno segrevanje	400	0,52	0,06
	500	0,55	0,07
	600	0,53	0,07
Klasično serevanje	400	0,59	0,08
	500	0,64	0,08
	600	0,63	0,08

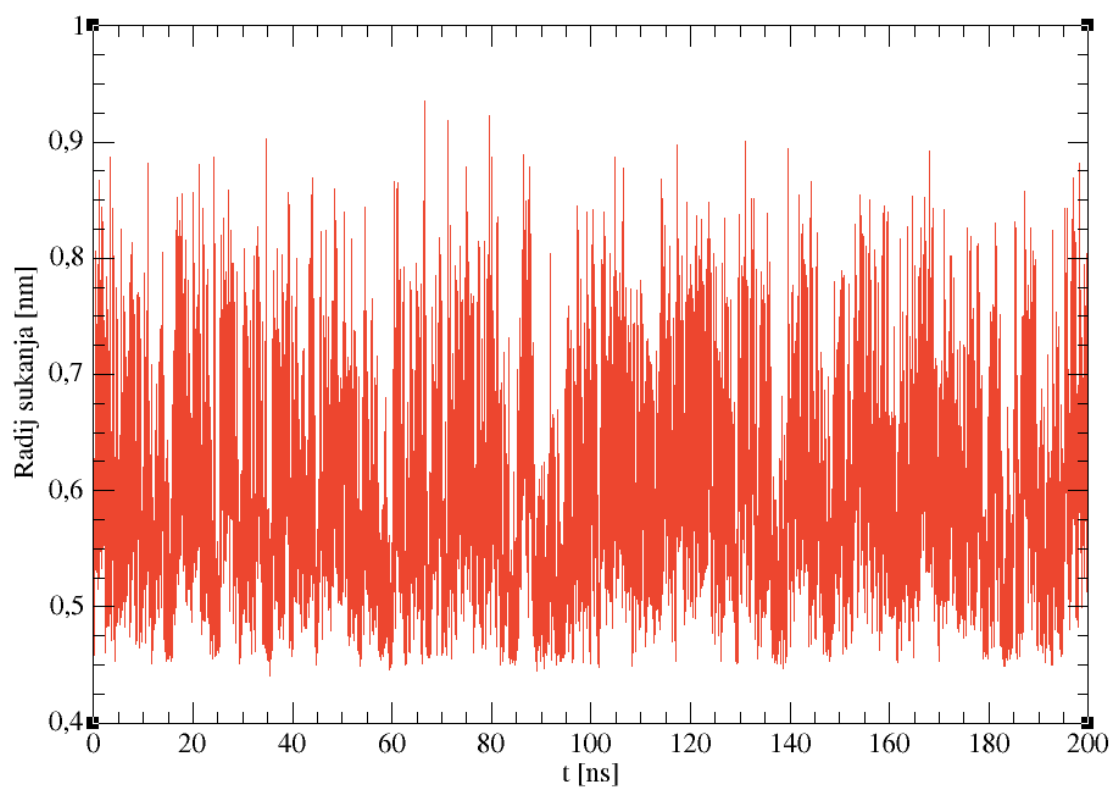


Slika 4-7 Radij sukanja za referenčni primer pri 300K

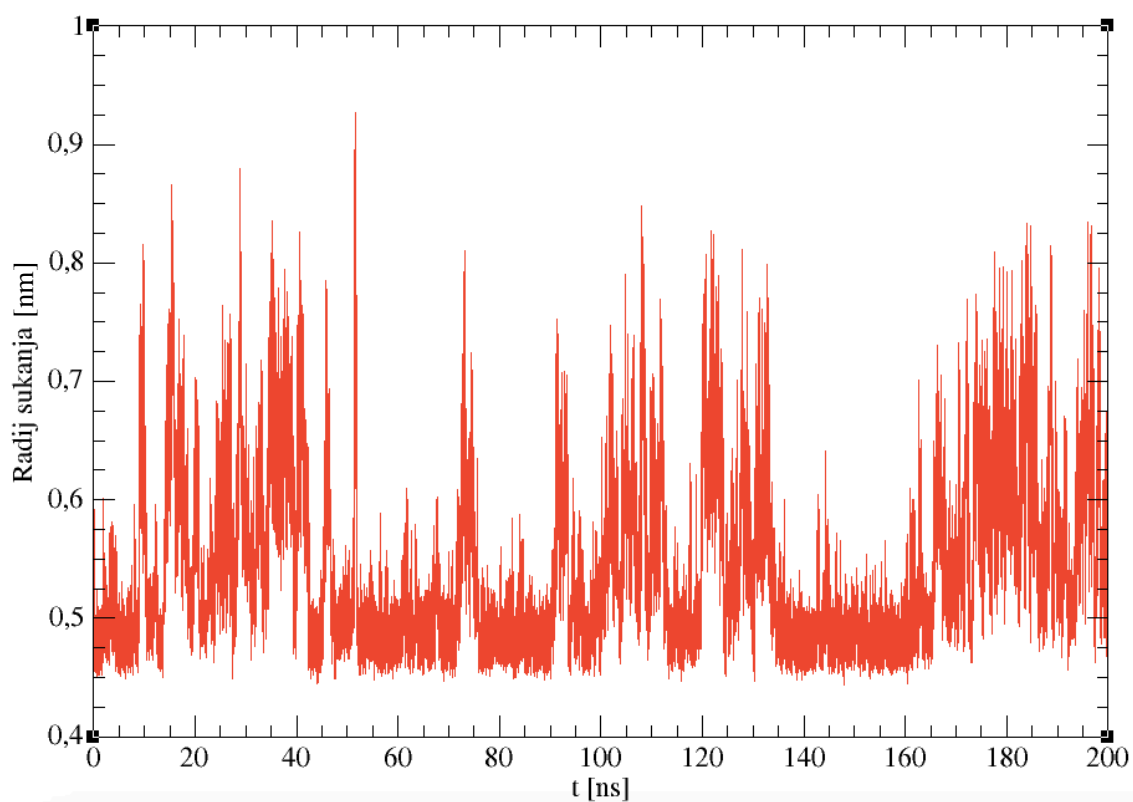


Slika 4-8 Radij sukanja za mikrovalovno segrevanje pri 400K

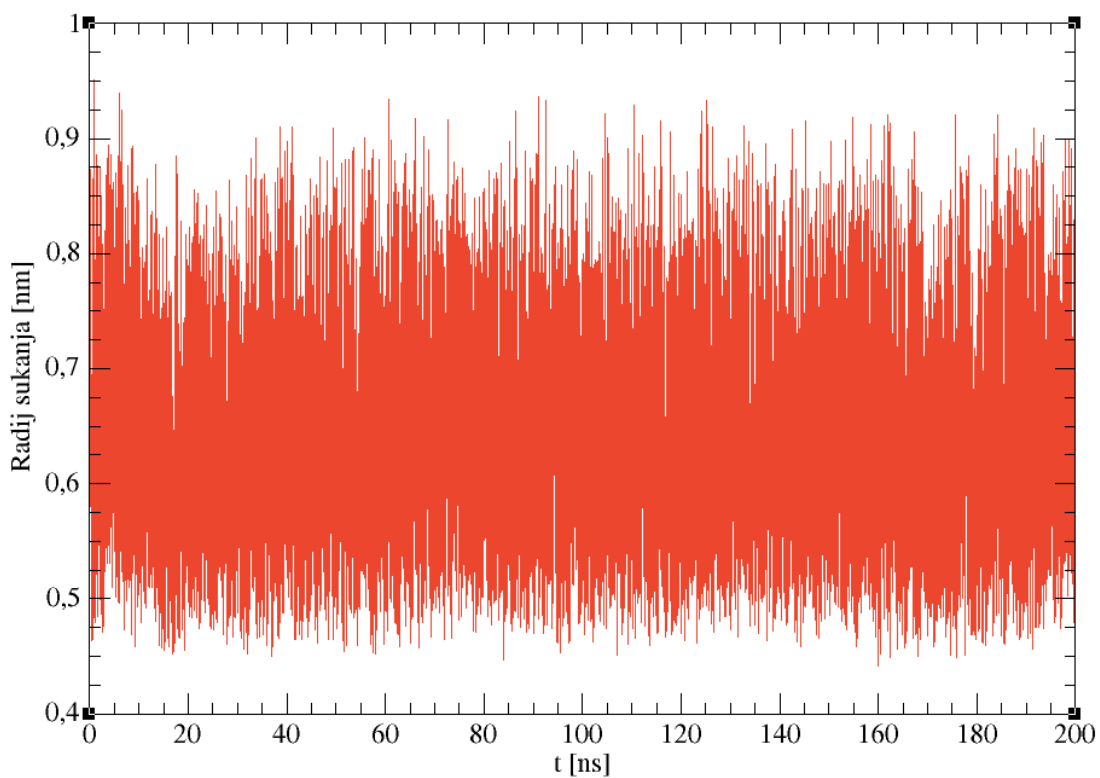




Slika 4-9 Radij sukanja za klasično segrevanje pri 400 K



Slika 4-10 Radij sukanja za mikrovalovno segrevanje pri 600 K



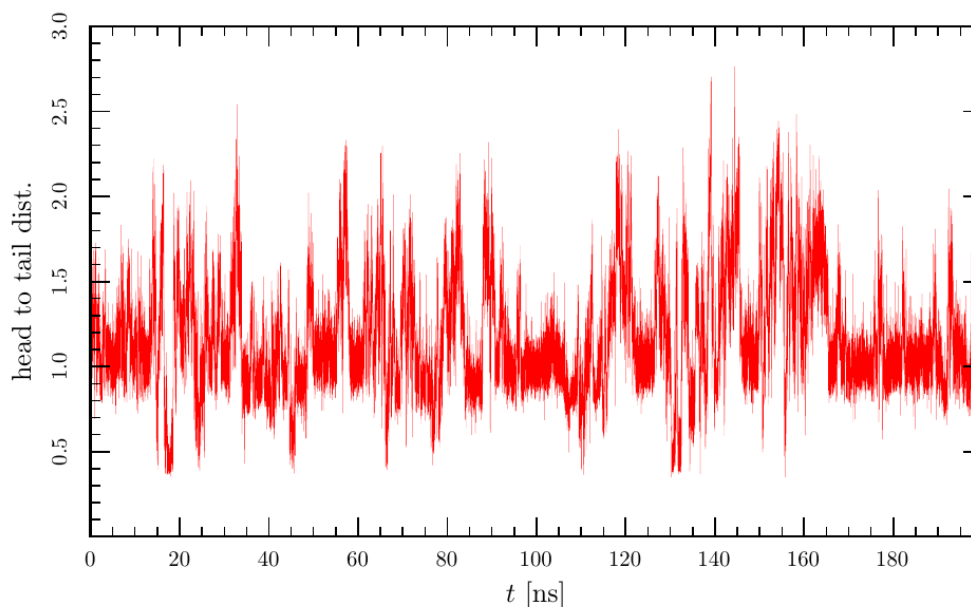
Slika 4-11 Radij sukanja za klasično segrevanje pri 600 K

#### 4.4 Rezultati analize razdalje med prvim in zadnjim fragmentom vijačnice

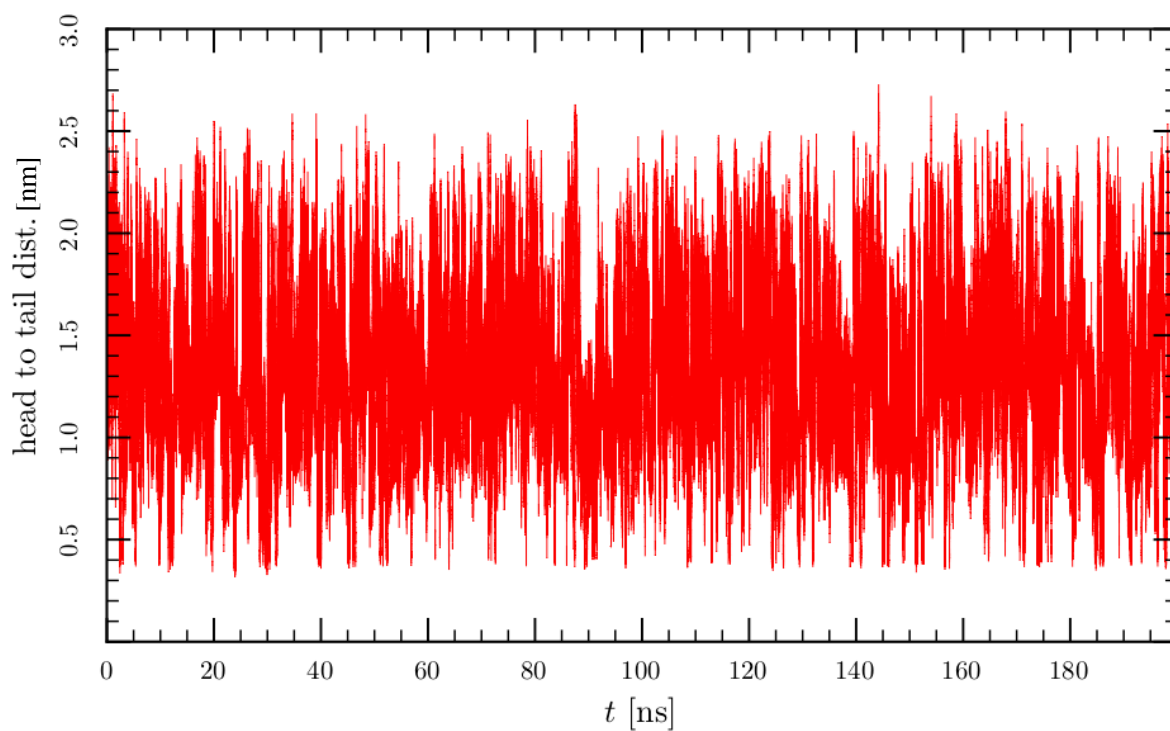
Za naslednjo merilo zvitosti smo izračunali razdaljo med prvim in zadnjim fragmentom vijačnice. Tudi tukaj so bila izpolnjena naša pričakovanja, saj je bila razdalja pri mikrovalvnem segrevanju manjša kot pri klasičnem. Razdalja med fragmentoma se z višanjem rotacijske temperature bistveno ne spreminja. Povprečne razdalje so zbrane v Tabela 4-4. Grafičen prikaz vidimo na slikah od 4-12 do 4-16.

Tabela 4-4: Razultati analize razdalje med prvim in zadnjim atomom vijačnice.

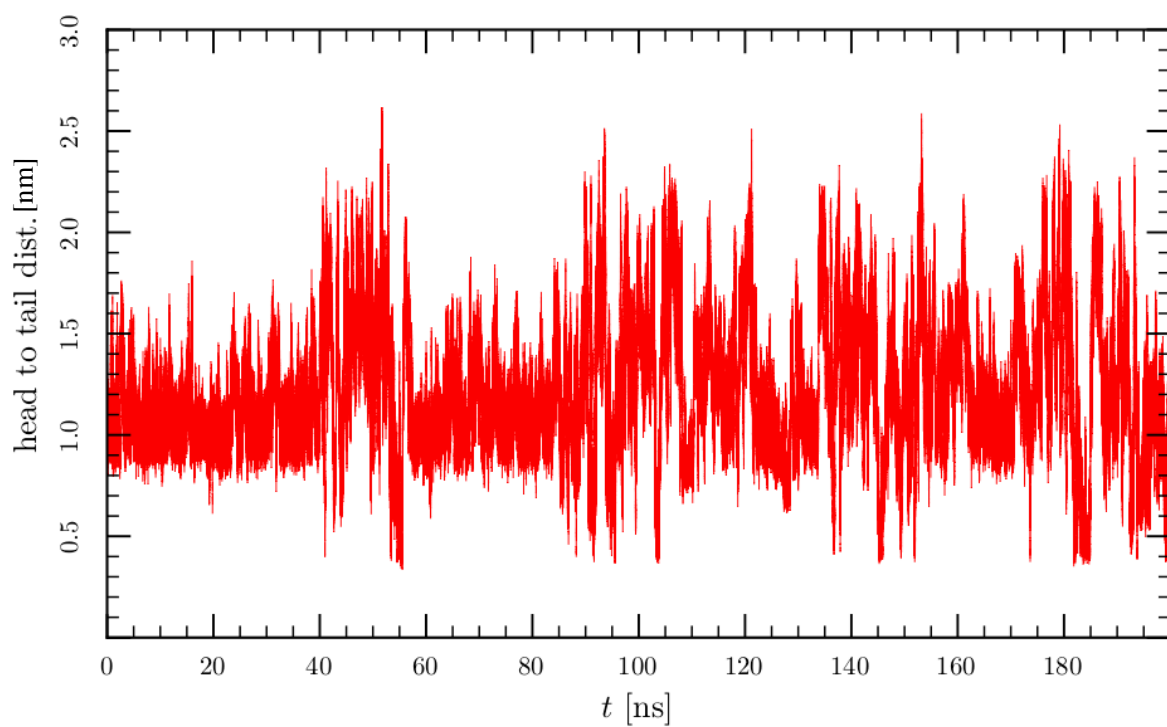
	T [K]	Razdalja med prvim in zadnjim fragmentom vijačnice [nm]	
		Povprečje	Standardna deviacija
<b>Referenca</b>	300	1,16	0,33
<b>Mikrovalovi</b>	400	1,21	0,34
	500	1,15	0,36
	600	1,17	0,36
<b>Klasično segrevanje</b>	400	1,35	0,40
	500	1,54	0,41
	600	1,48	0,43



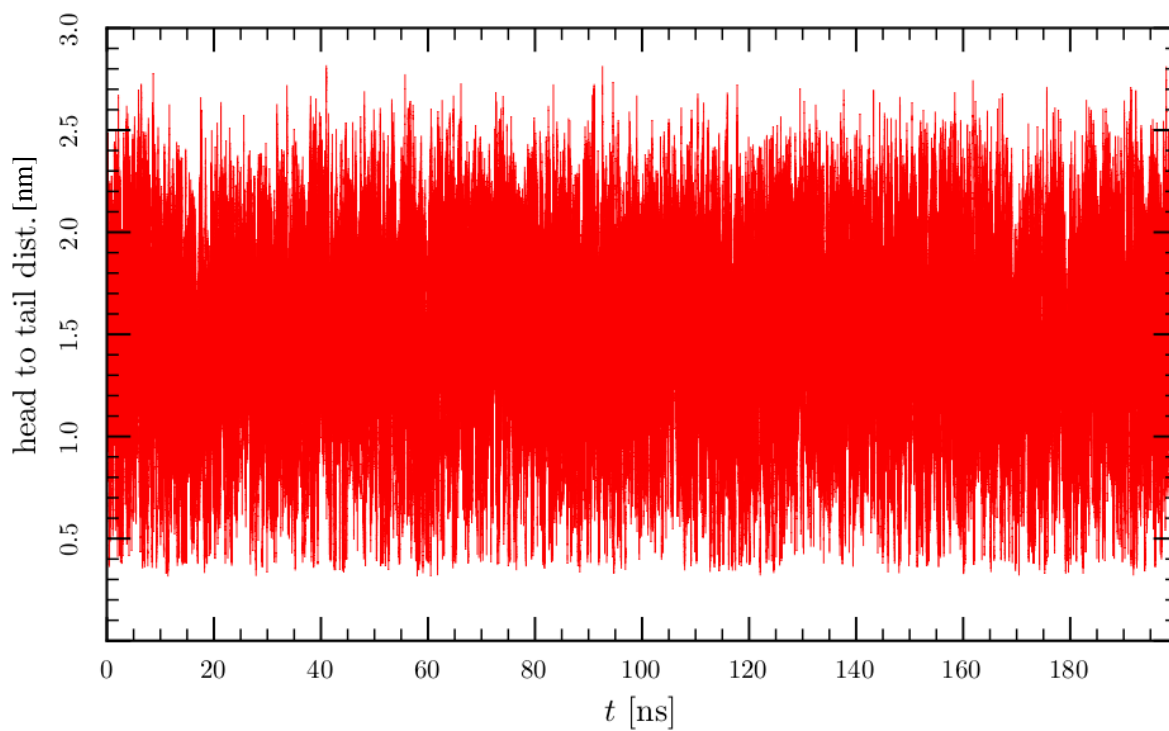
Slika 4-12 Razdalja med prvim in zadnjim fragmentom v sistemu na 300 K



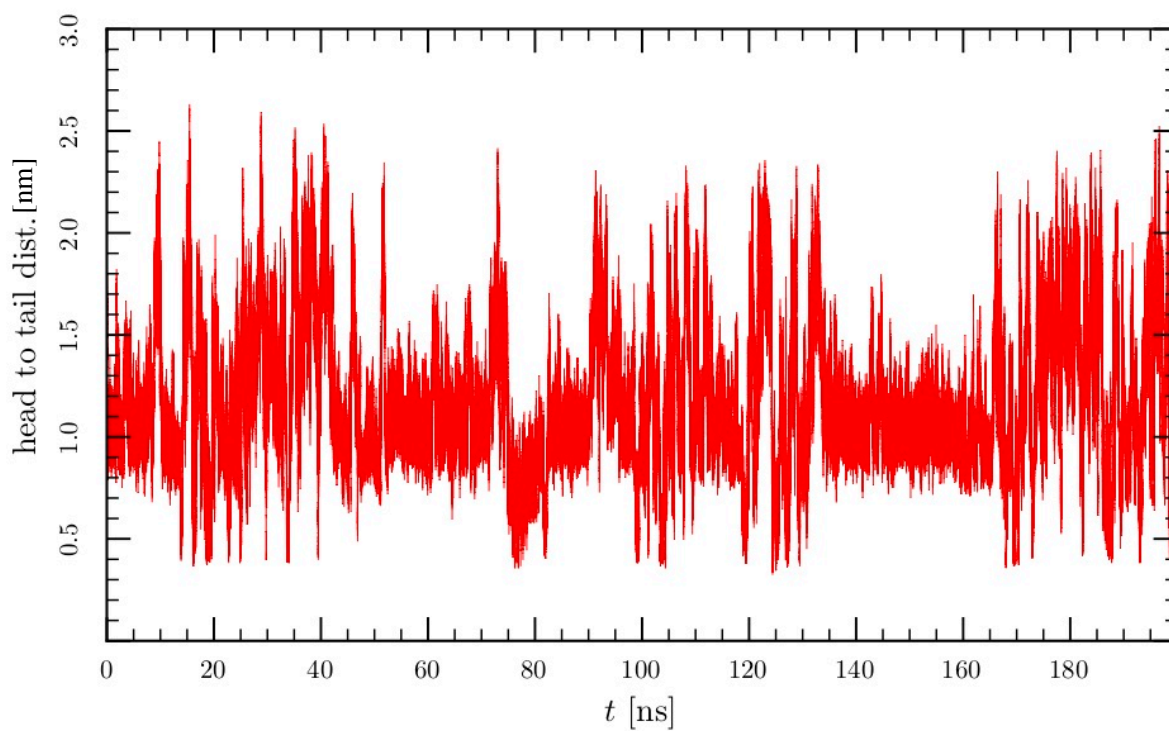
Slika 4-13 Razdalja med prvim in zadnjim fragmentom pri klasičnem segrevanju na 400 K



Slika 4-14 Razdalja med prvim in zadnjim fragmentom pri mikrovalovnem segrevanju na 400 K



Slika 4-15 Razdalja med prvim in zadnjim fragmentom pri klasičnem segrevanju na 600 K



Slika 4-16 Razdalja med prvim in zadnjim fragmentom pri mikrovalovnem segrevanju na 600K

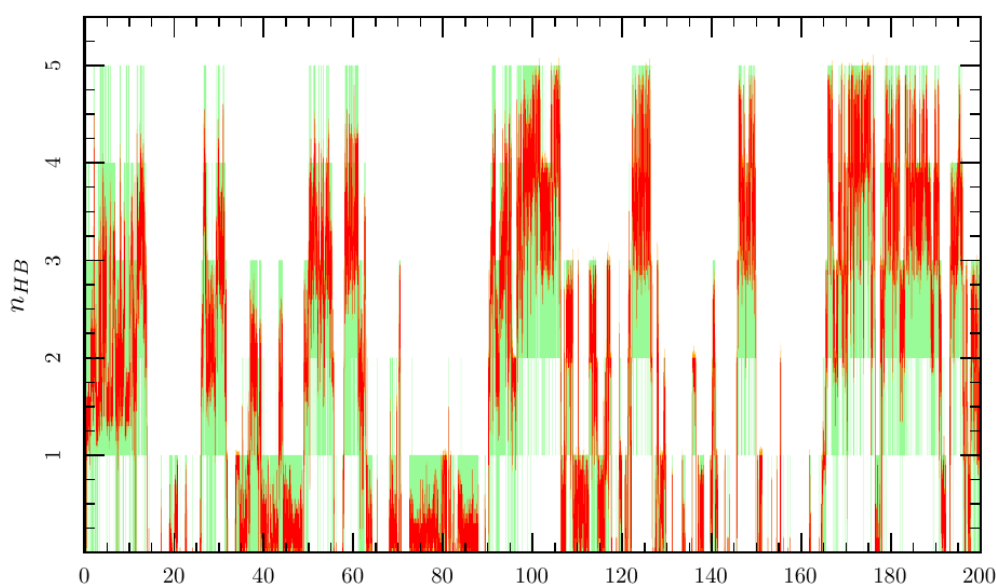
#### 4.5 Rezultati analize vodikovih vezi

Analiza prisotnih vodikovih vezi v vijačnici je pokazala večje število vezi pri simulaciji mikrovalovnega segrevanja kot pri klasičnem segrevanju. Pri rotacijskih temperaturah do 500 K število vodikovih vezi pade in se pri povišanju na 600 K spet poveča. To je verjetno posledica prekinitve vodikovih vezi z metanolom. Posledica povečanega števila vodikovih vezi med atomi vijačnice je večja rigidnost konformacij, kar se sklada z analizo klastrov. Pri klasičnem segrevanju višanje temperature topila privede do večje gibljivosti peptida, kar povzroči zmanjšanje števila intramolekularnih vodikovih vezi. Posledično dobimo več neobstojevnih konformacij. Rezultati simulacij so prikazani v tabeli 4-5 in grafih na slikah 4-17 - 4-21.

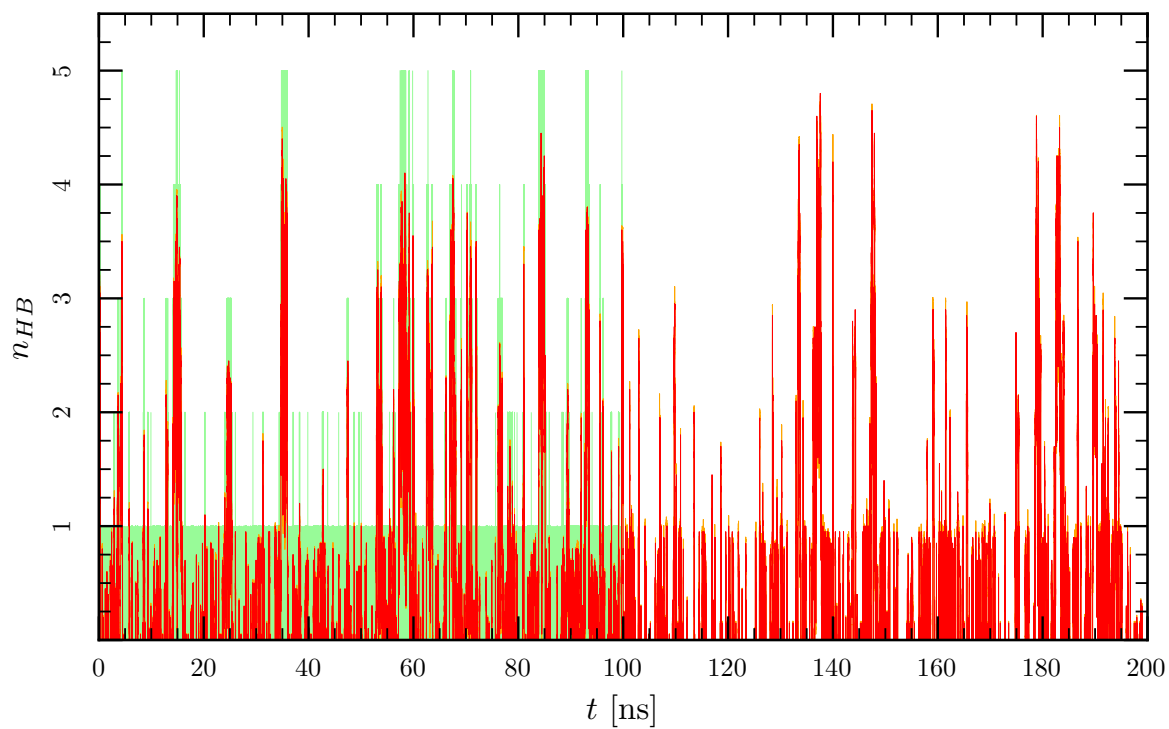
Tabela 4-5: Rezultati analize prisotnih vodikovih vezi, ki se tvorijo med atomi vijačnice.

	T [K]	Število prisotnih vodikovih vezi, ki tvorijo vijačnico	Število prisotnih vodikovih vezi med peptidom in metanolom
<b>Referenca</b>	300	1,6	8,63
<b>Mikrovalovno segrevanje</b>	400	1,5	9,00
	500	0,87	9,11
	600	1,29	8,78
	400	0,82	8,44
<b>Klasično segrevanje</b>	500	0,32	7,29
	600	0,31	6,24

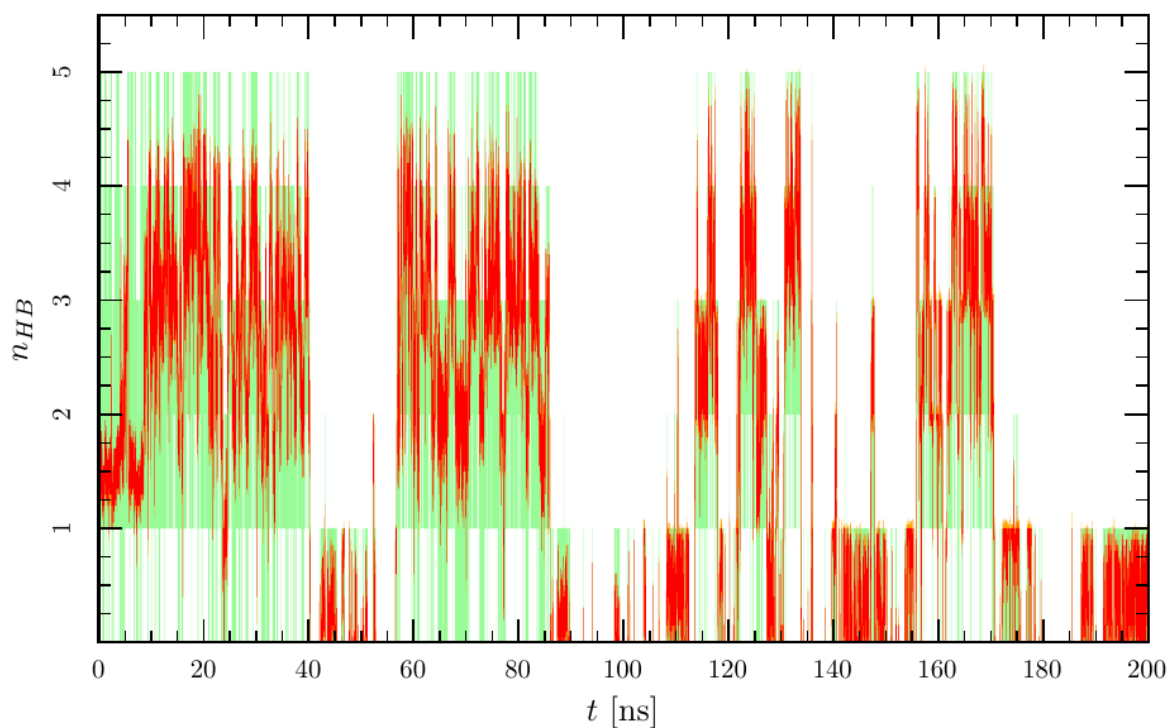
Na naslednjih grafih zelena črta ponazarja dejanske meriteve rdeča pa povprečje.



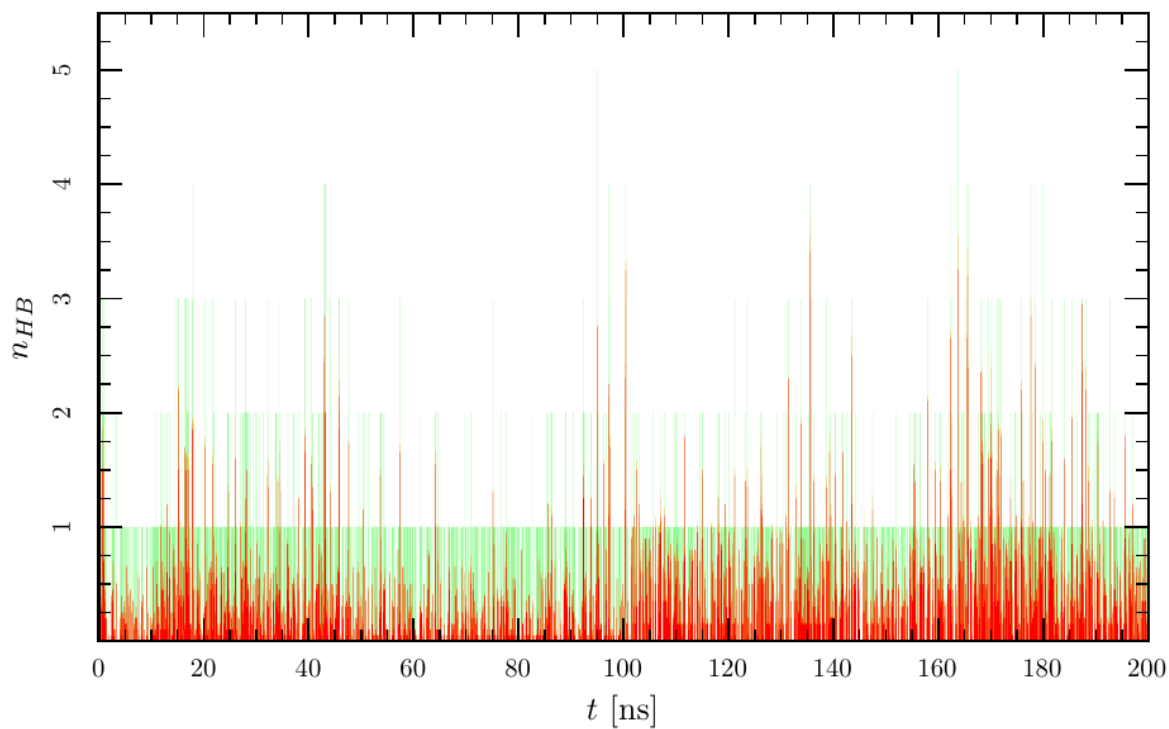
Slika 4-17 Število prisotnih intramolekularnih vodikovih vezi in njihovo tekoče povprečje za sistem pri 300K



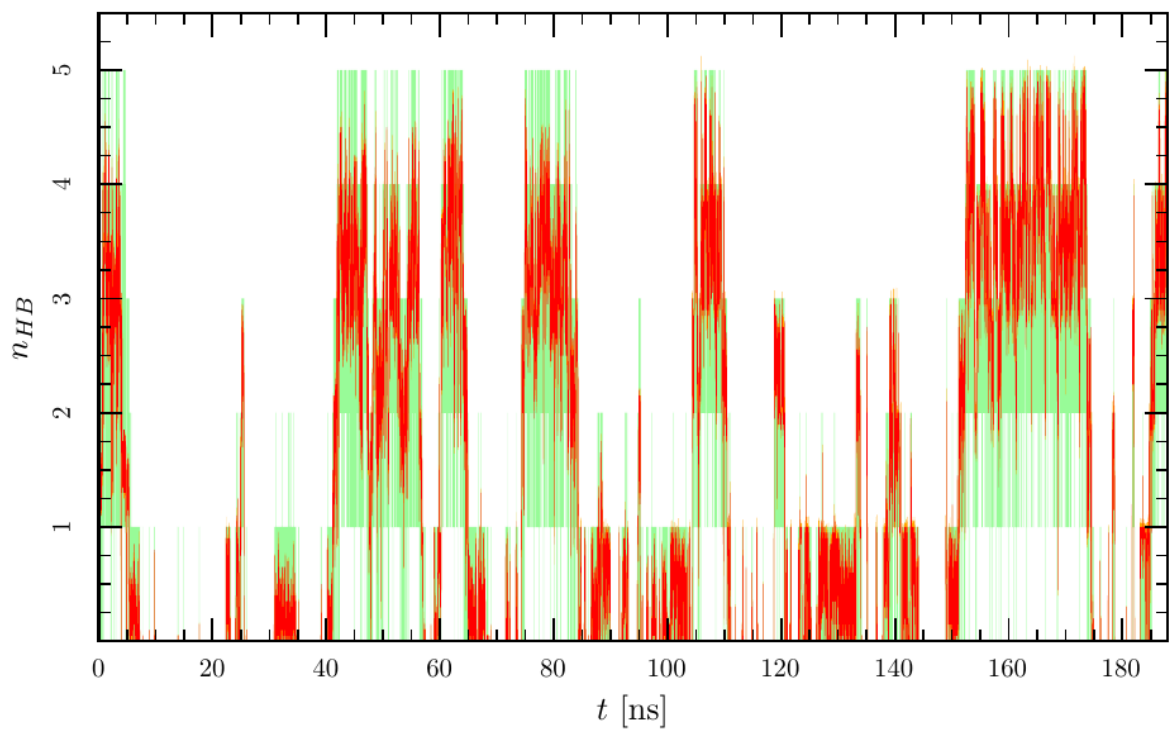
Slika 4-18 Število prisotnih intramolekularnih vodikovih vezi in njihovo tekoče povprečje za navadno segrevanje pri 400K



Slika 4-19 Število prisotnih intramolekularnih vodikovih vezi in njihovo tekoče povprečje za mikrovalovno segrevanje pri 400K



Slika 4-20 Število prisotnih intramolekularnih vodikovih vezi in njihovo tekoče povprečje za klasično segrevanje pri 600K



Slika 4-21 Število prisotnih intramolekularnih vodikovih vezi in njihovo tekoče povprečje za mikrovalovno segrevanje pri 600K



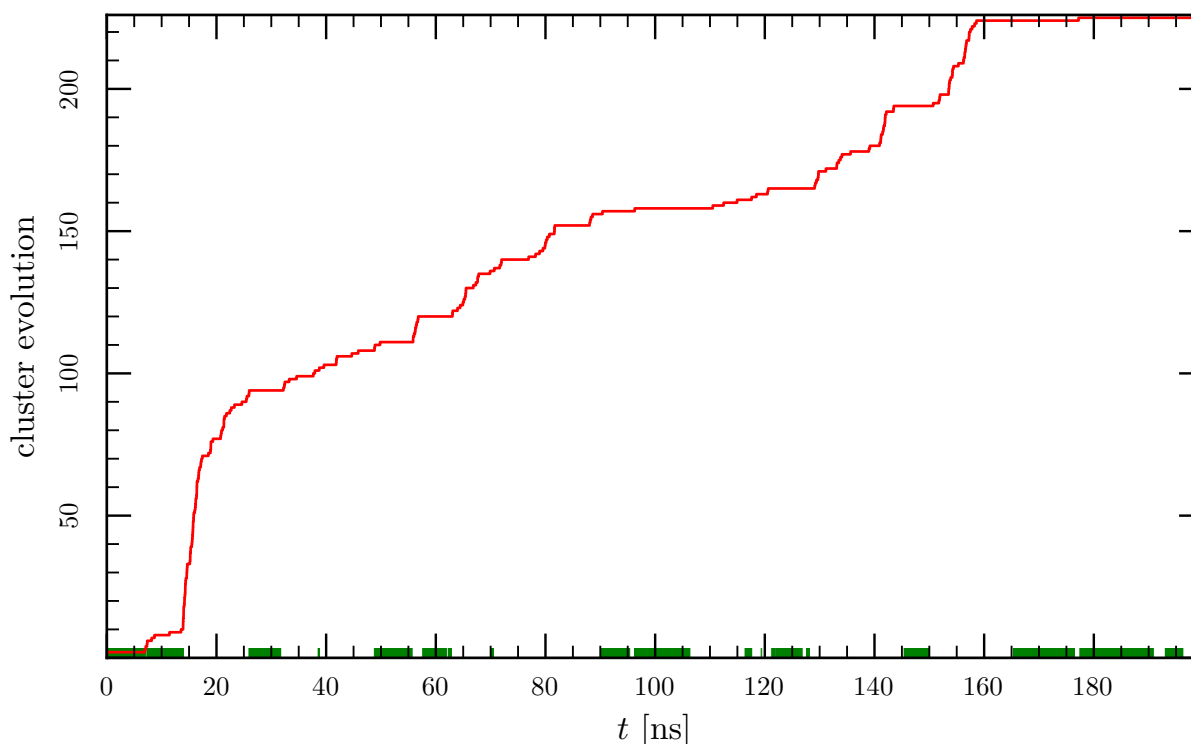
## 4.6 Rezultati analize gruč

Analiza klastrov je pokazala, da se število klastrov podobnih struktur, ki so prisotni vsaj 5% časa, ne spremeni bistveno z višanjem rotacijske temperature. V primeru klasičnega segrevanja pa pri temperaturah nad 400K ni več gruč, ki bi bile obstojne vsaj 5% simulacije. Z zmanjšanjem obstojnosti klastrov pa se poveša število vseh klastrov. Iz razultatov je razvidno, da je pri klasičnem segrevanju prisotnih bistveno več konformacij. Iz tega sklepamo, da mikrovalovi ojačajo intramolekularne interakcije peptida, kar vodi do večje rigidnosti konformacije in s tem do manjšega števila gruč. Poleg števila gruč v Tabeli 4-6 lahko vidimo porast števila gruč od 100 ns do 200 ns.

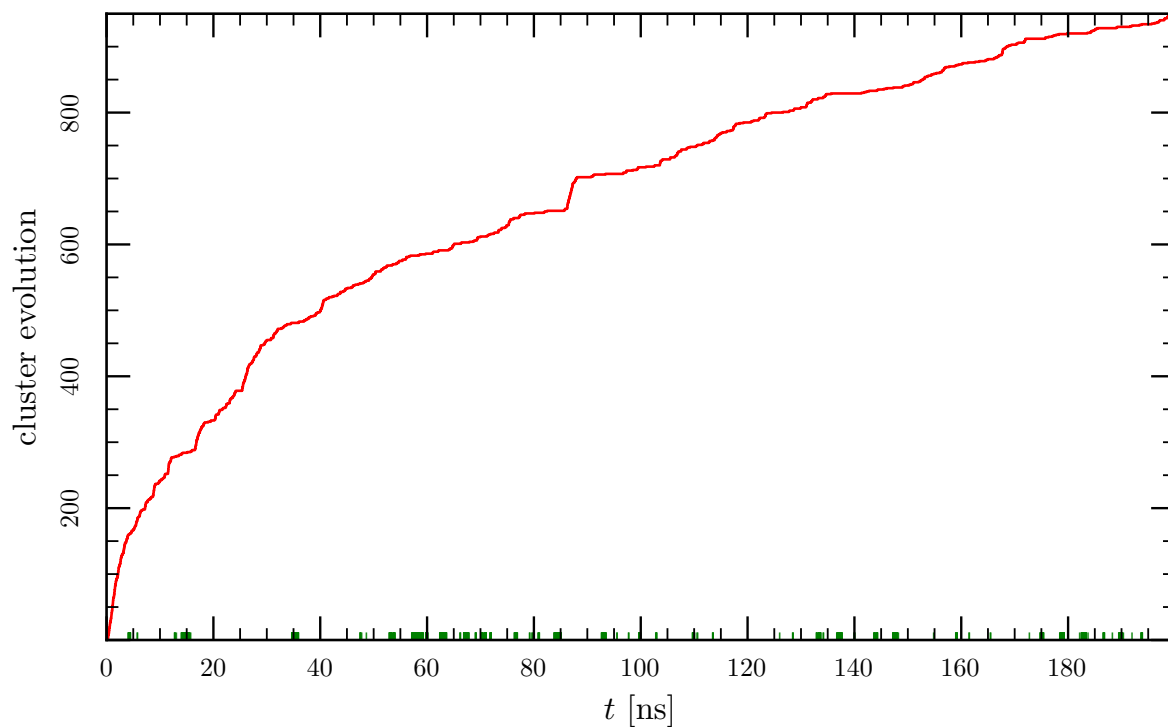
Tabela 4-6: Rezultati analize klastrov

	T [K]	Št. gruč prisotnih vsaj 5% časa	Št gruč, ki predstavlja 95 % trajektorije	Relativno povečanje med 100 in 200 ns [%]
<b>Referenca</b>	300	4	53	43,0
<b>Mikrovalovi</b>	400	3	74	66,7
	500	4	83	26,3
	600	3	117	48,6
<b>Normalno segrevanje</b>	400	2	410	32,5
	500	0	796	17,6
	600	0	2118	39,3

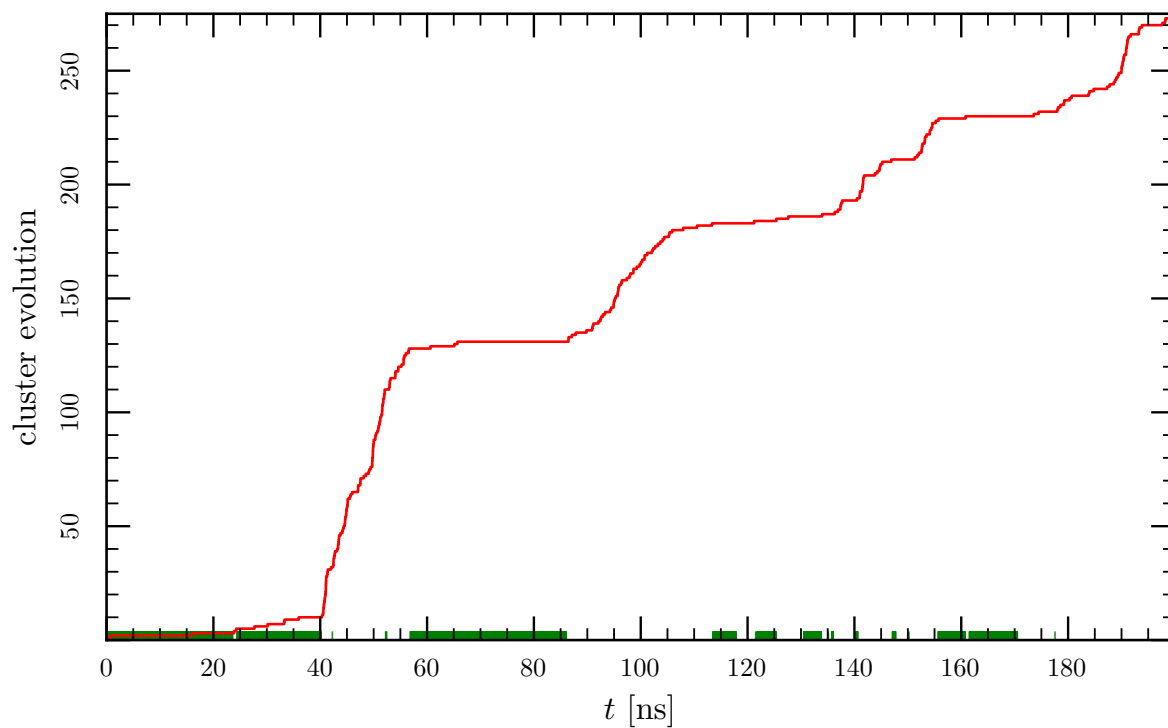
Slidi še grafična predstavitev dobljenih rezultatov na slikah od 4-22 do 4-26. Rdeča črta predstavlja skupno število klastrov, zelene točke pa prisotnost eksperimentalno določene strukture.



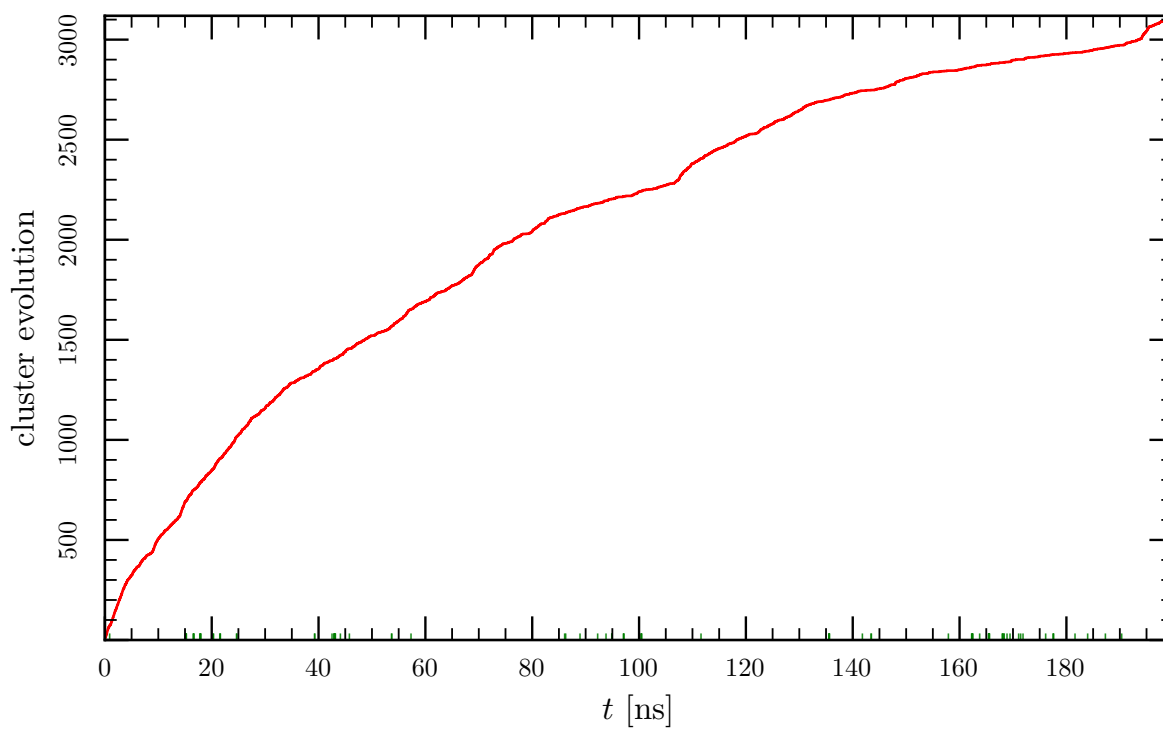
Slika 4-22 Kumulativno število gruč za sistem pri 300 K



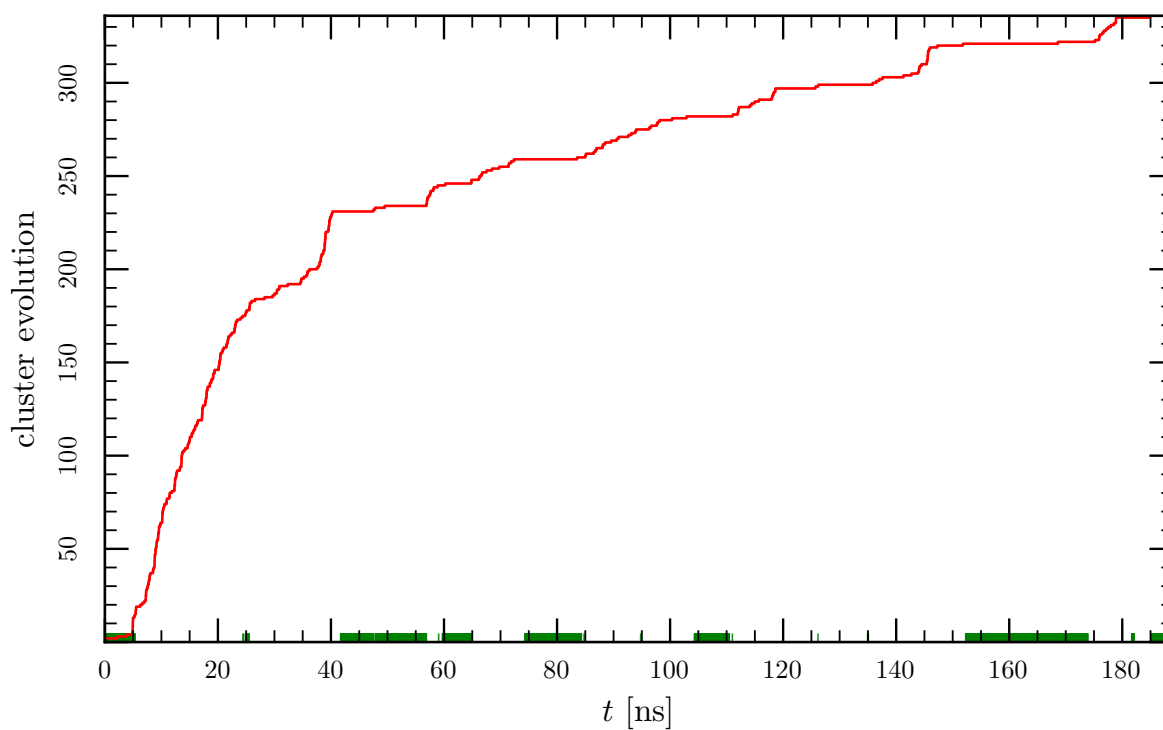
Slika 4-23 Kumulativno število gruč za klasično segrevanje pri 400 K



Slika 4-24 Kumulativno število klastrov za mikrovalovno segrevanje pri 400 K



Slika 4-25 Kumulativno število klastrov za klasično segrevanje pri 600 K



Slika 4-26 Kumulativno število klastrov za mikrovalovno segrevanje pri 600 K

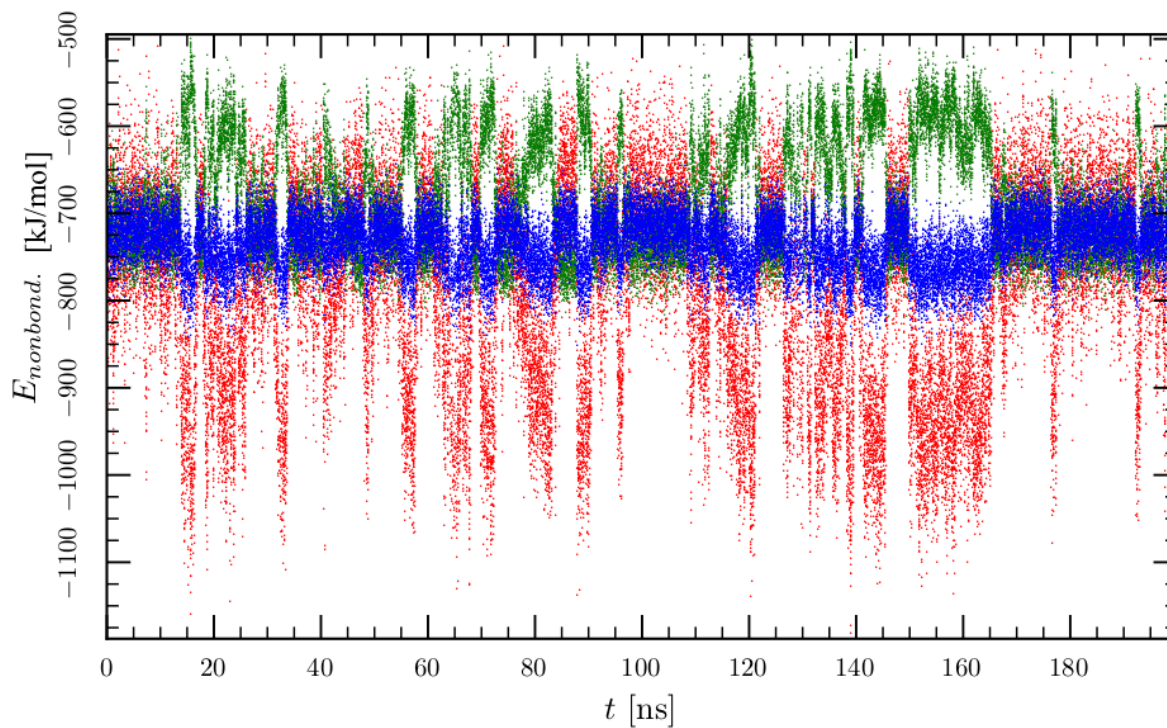
## 4.7 Rezultati analize neveznih energij

Izračuni povprečnih neveznih energij so pokazale večje vrednosti pri klasičnem segrevanju beta peptida. Iz tega lahko spet sklepamo na večjo skrčenost beta peptida pod vplivom mikrovalov. V tabeli 4-7 so prikazani rezultati za nevezno energijo peptid-topilo in peptid-peptid, van der Waalsove interakcije, elektrostatske interakcije med samim peptidom in peptidom s topilom.

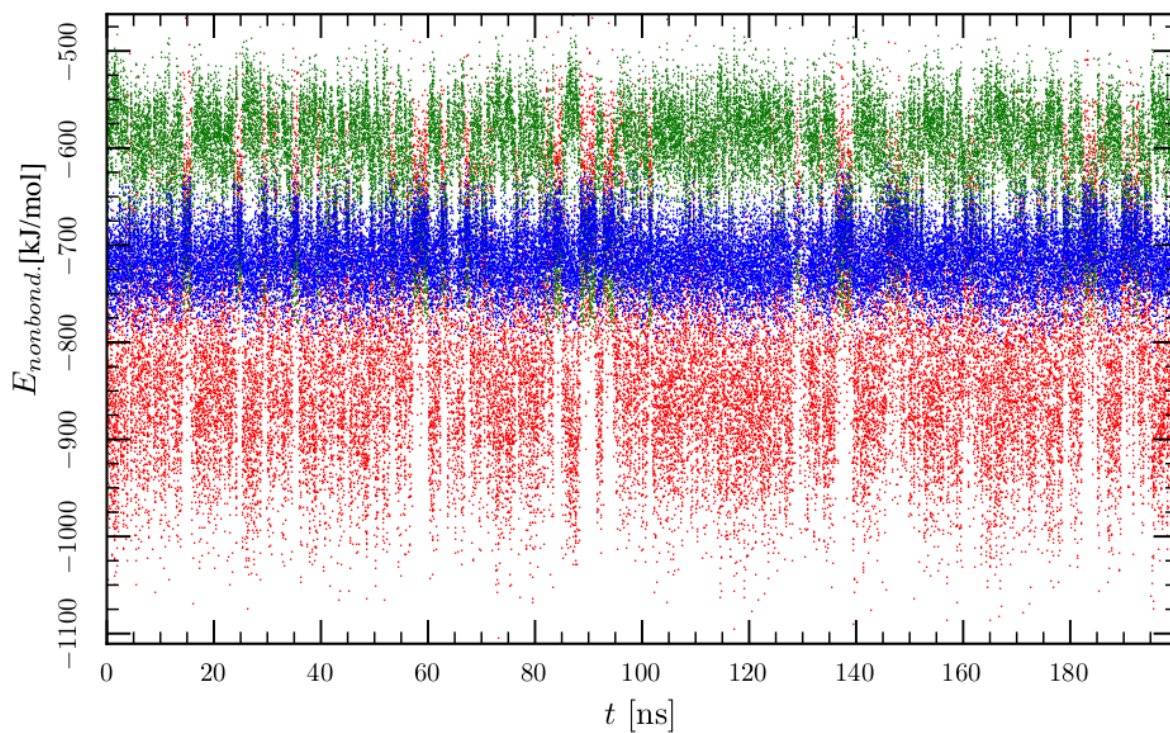
Table 4-7: Rezultati Analize neveznih energij

	T [K]	Skupna nevezna e. [kJ/mol]	VDW nevezna e. peptid-peptid [kJ/mol]	ES nevezna e. peptid-peptid [kJ/mol]	VDW nevezna e. peptid- metanol [kJ/mol]	ES nevezna e. peptid- metanol [kJ/mol]
<b>Referenca</b>	300	-1482	-99	-585	-306	-493
	400	-1489	-96	-578	-312	-502
<b>Mikrovalovi</b>	500	-1492	-96	-573	-311	-511
	600	-1489	-96	-573	-307	-513
<b>Klasično segrevanje</b>	400	-1437	-78	-541	-313	-506
	500	-1378	-52	-543	-313	-470
	600	-1317	-48	-536	-303	-430

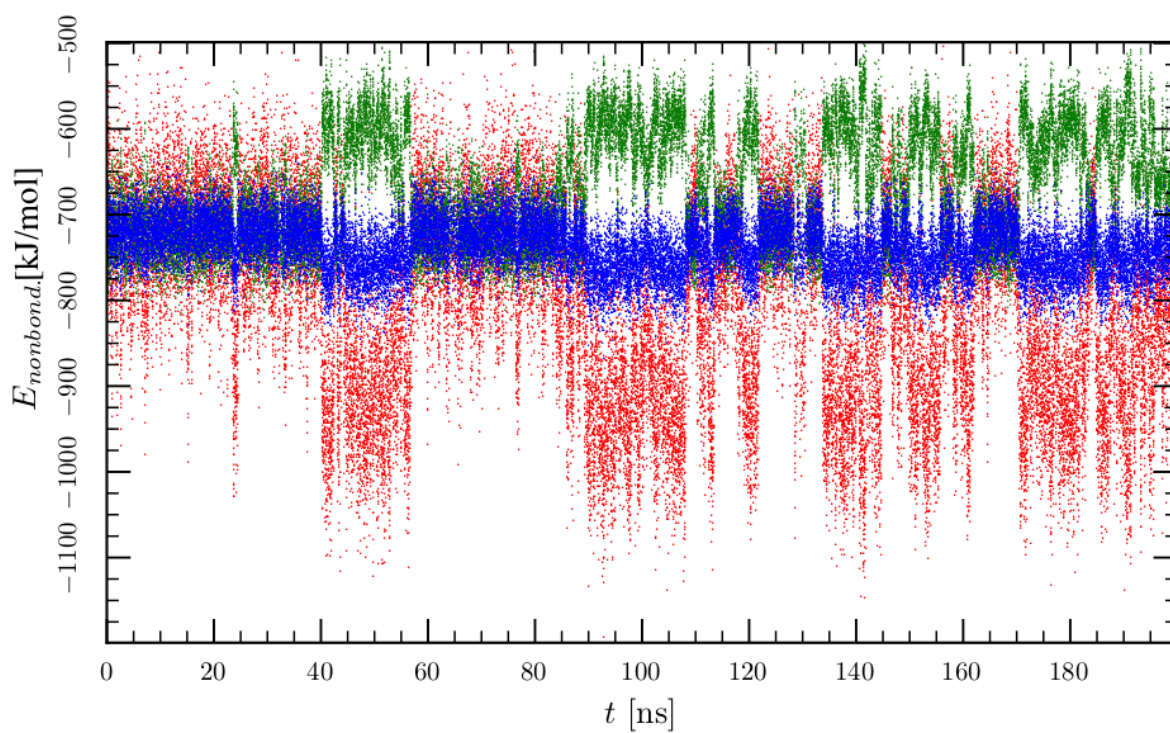
Na slikah od 4-27 do 4-31 vidimo grafičen prikaz neveznih energij, kjer so rdeče točke interakcije med peptidome in topilom, zelene točke interakcije med samim peptidom in modre točke polovica skupne nevezne energije.



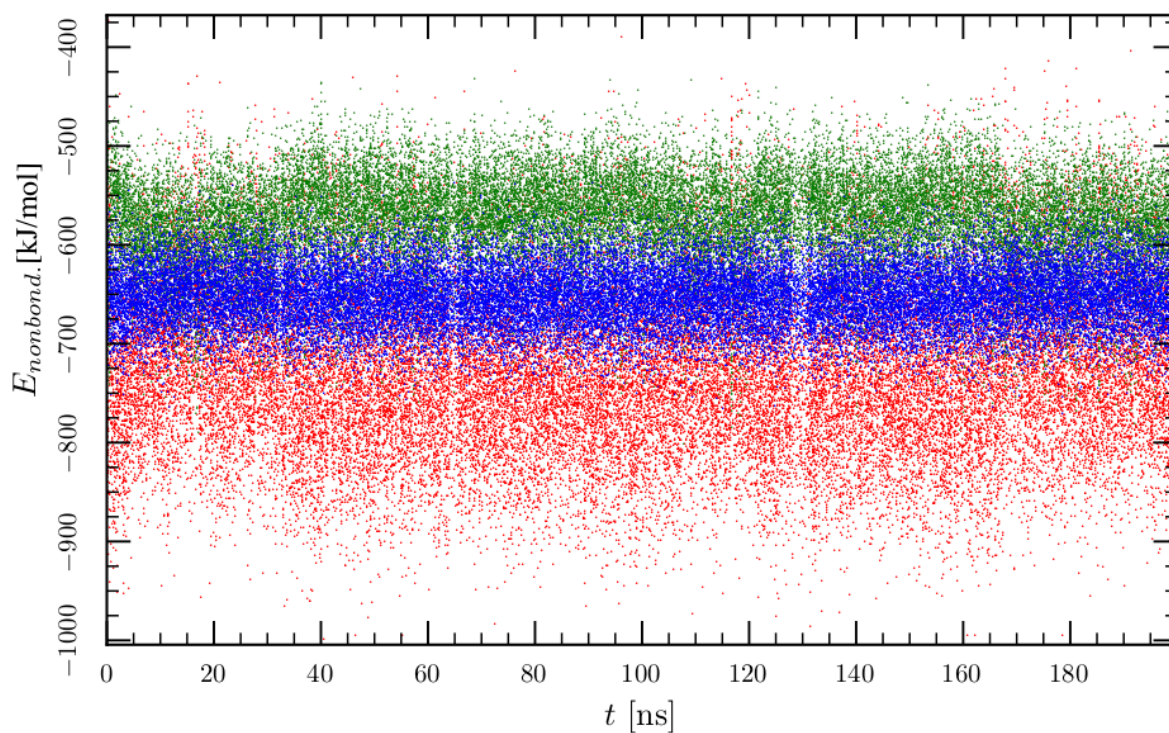
Slika 4-27 Nevezna energija pri navadnem segrevanju 300 K



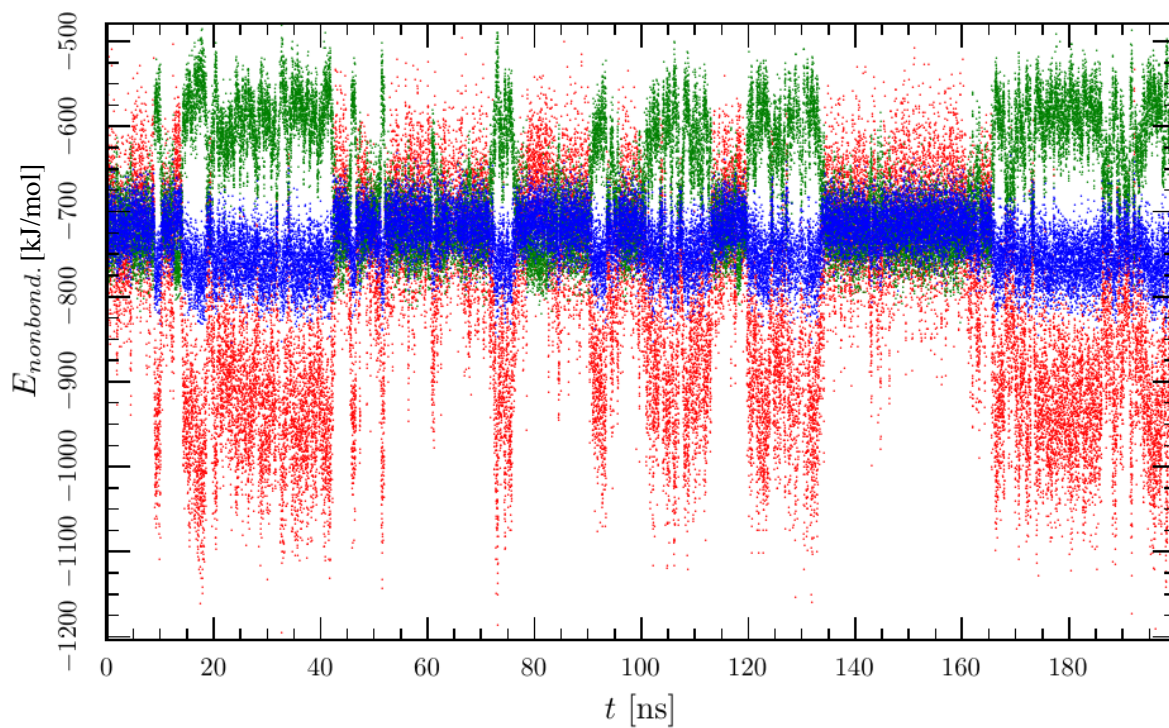
Slika 4-28 Nevezna energija pri navadnem segrevanju 400 K



Slika 4-29 Nevezna energija pri mikrovalovnem segrevanju 400 K



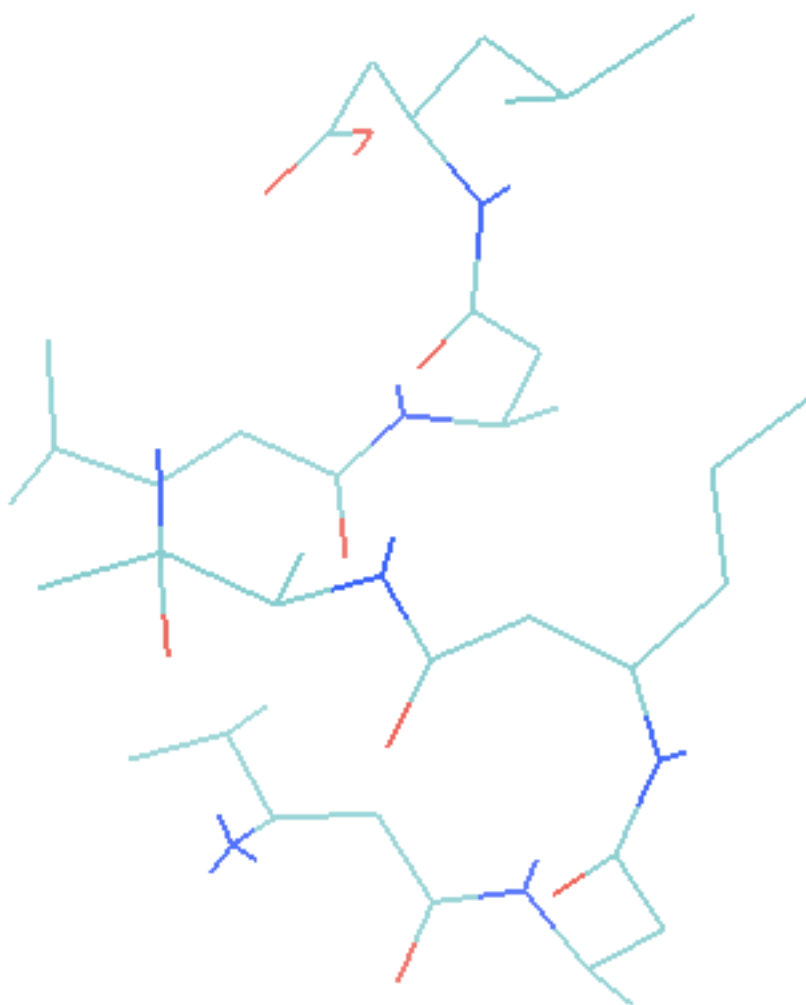
Slika 4-30 Nevezna energija pri klasičnem segrevanju 600 K



Slika 4-31 Nevezna energija pri mikrovalovnem segrevanju 600 K

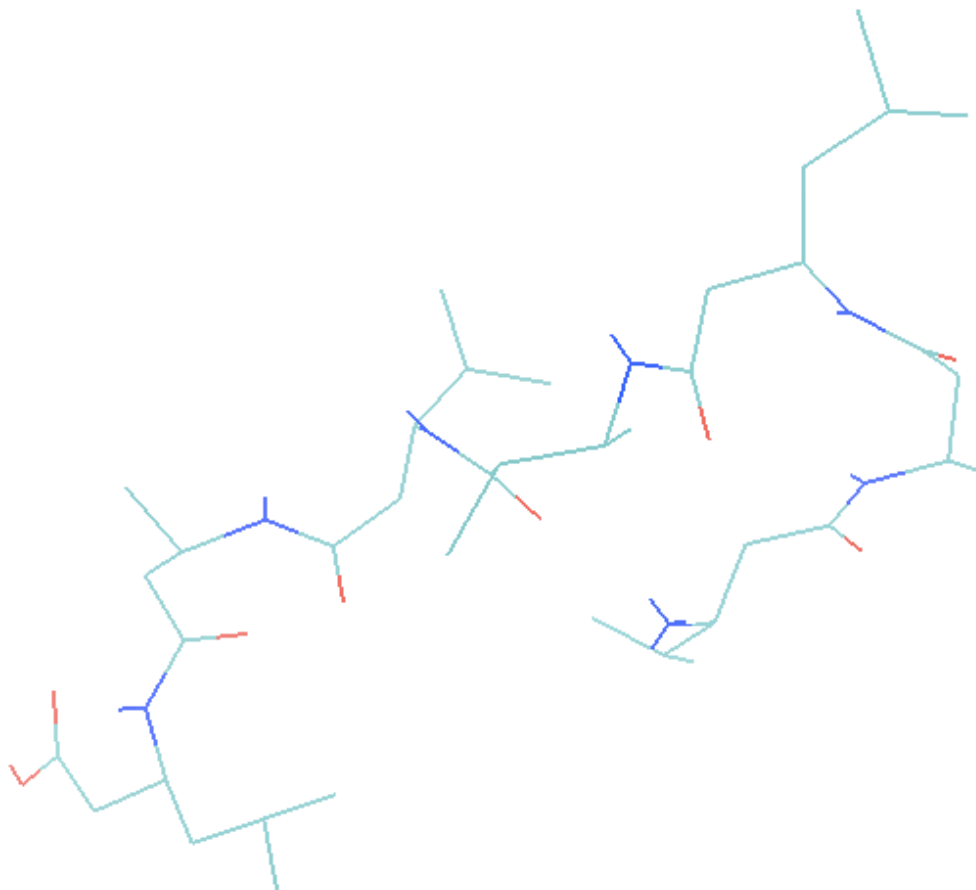
#### 4.8 Vizualni prikaz končnih struktur

V nadaljevanju smo opravili vizualno analizo in primerjavo molekul pri klasičnem segrevanju ter segrevanju z mikrovalovi. Slike od 4-32 do 4-36 služijo kot pomoč pri razumevanju dinamike beta peptida in se skladajo z opažanji in računsko dobljenimi rezultati. Stičišča sivih črt predstavljajo ogljik, sivih in modrih dušik ter sivih in rdečih kisik.

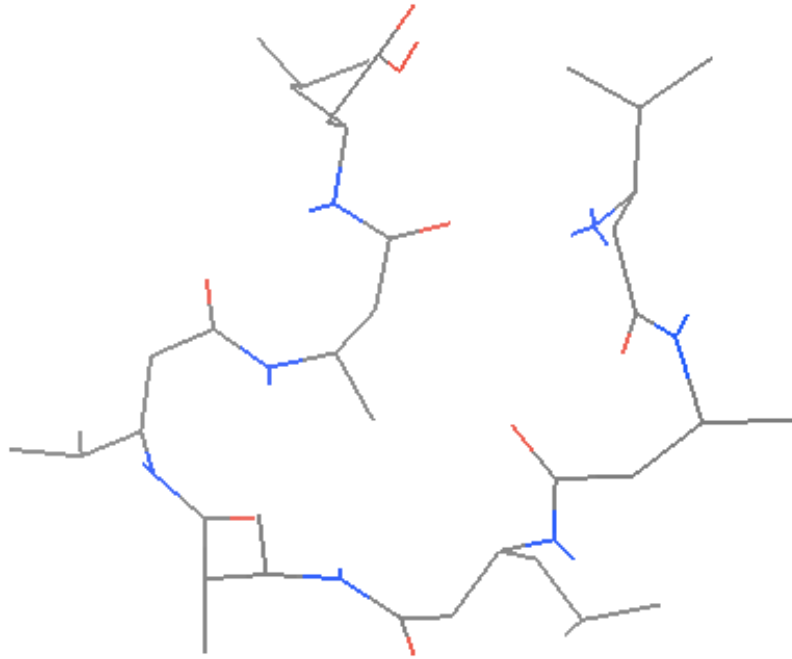


Slika 4-32 Vizualni prikaz molekule beta peptida pri 300 K

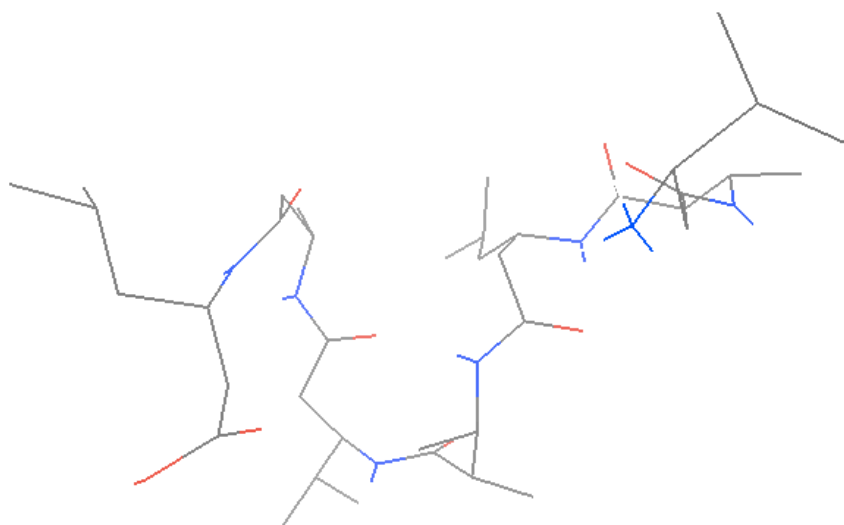




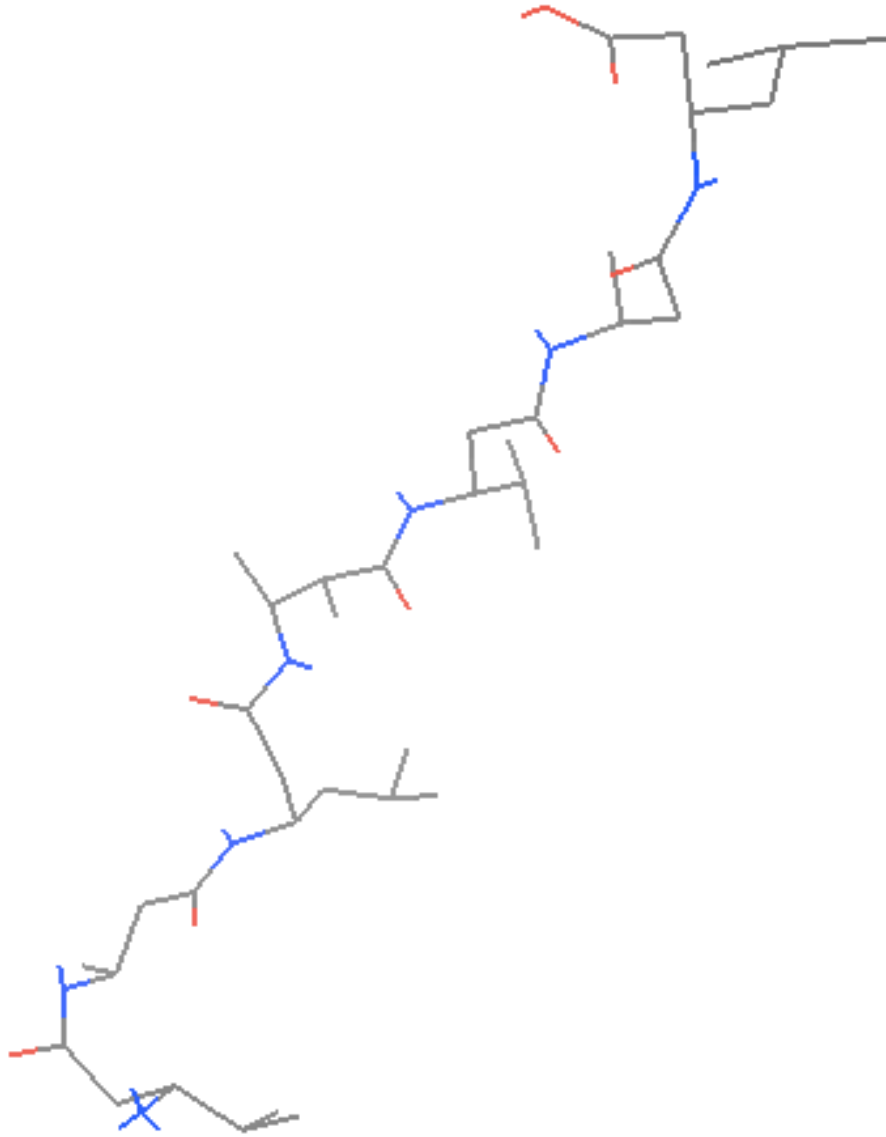
Slika 4-33 Vizualni prikaz molekule beta peptide pri mikrovalovnem segrevanju na 400K



Slika 4-34 Vizualni prikaz beta peptida pri klasičnem segrevanju na 400K



Slika 4-35 Vizualni prikaz beta peptide pri mikrovalovnem segrevanju na 600K



Slika 4-36 Vizualni prikaz beta peptide pri klasičnem segrevanju na 600K

## 5 Zaključek

Naš cilj je bil ugotoviti vpliv mikrovalov na zvijanje betapeptida z računalniškim pristopom. S tem namenom smo za simulacijo mikrovalov uporabili metodo ločenih termostatov, ki je bila že prej uspešno uporabljena za simulacijo vpliva mikrovalovnega valovanja na preproste kemijske sisteme. Primerjali smo klasično segrevanje in segravanje z mikrovalovi. Dobljene strukture smo primerjali tudi z referenčno strukturo betapeptida, ki so jo eksperimentalno določili z NMR analizo.

Po končanih simulacijah MD smo izvedli analize gruč, RMSD, RMSF, razdalje med prvim in zadnji atomom vijačnice, energijske analize ter še s pomočjo programa VMD vizualno predstavili vpliv mikrovalov.

V primerjavi z klasičnim segrevanjem smo odkrili več bolj stabilnih klastrov, večje število vodikovih vezi prisotnih med atomi vijačnice, manjšo odstopanje od referenčne strukture, manjšo razdaljo med konci vijačnice ter manjše nevezne energije. Ti rezultati so nas privedli do zaključka, da rotacijsko gibanje molekul metanola, ki je posledica mikrovalov, povzroči prekinitev vodikovih vezi med topljencem in topilom. To vodi v tvorbo vodikovih vezi med atomi vijačnice peptida in do stabilizacije strukture.

To raziskavo bi lahko razširili tako, da bi preizkušali obnašanje v vodi, kar bi bilo bolj podobno okolju peptidov v našem telesu. To bi lahko vodilo do pomembnih spoznanj, ki se navezujejo na bolezni, ki jih povzročajo proteinski agregati kot so Alzheimerjeva, Parkinsonova, Kreuzfeld-Jakobova bolezen in nekatere vrste rakov. Spoznanja bi lahko bila koristna tudi za preučevanje mikrovalovne katalize, kjer z mikrovalovi pospešimo potek biokemijskih reakcij.

## 6 Literatura

- [1] B. S. A. D. K. N. T. S. D. B. A. I. R. D. D. J. E. P. M. C. D. I. de Pomerai, "Microwave radiation can alter protein conformation without bulk heating," *FEBS Letters*, vol. 543, pp. 93-97, 2003.
- [2] F. U. Hartl, "Protein Misfolding Diseases," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 86, pp. 21-26, 2017.
- [3] N. S. K. D. S. E. B. B. D. ., A. T. M. Bourdenx, "Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies," *Progress in Neurobiology*, vol. 1384, 2015.
- [4] S. L. H. T. I. Y. A. Budi, "Effect of external stresses on protein conformation: a computer modelling study," *European Biophysics Journal*, vol. 33, pp. 121-129, 2004.
- [5] D. J. U. Bren, "Individual degrees of freedom and the solvation properties of water," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 137, 2012.
- [6] D. J. M. E. M. Purcell, *Electricity and Magnetism*, Massachusetts: Harvard University, 2013.
- [7] R. T. Hitchcock, *Radio-Frequency and Microwave Radiation (3rd) Third Edition*, AIHA, 2004.
- [8] E. Lewars, *Computational Chemistry*, Peterborough: Kluwer Academic Publishers, 2003.
- [9] E. G. R. A. F. R. M. L. L. Y. Zhang, "Solvent Models for Protein–Ligand Binding: Comparison of Implicit Solvent Poisson and Surface Generalized Born Models with Explicit Solvent Simulations," *Journal Of Computational Chemistry*, vol. 22, no. 6, p. 591–607, 2001.
- [10] A. R. Leach, *Molecular Modelling Second Edition*, London: Pearson Education, 2001.
- [11] J. N. M. K. a. A. D. D. D. Young, "Microwave Activation of Enzymatic Catalysis," *JACS*, p. 10048–10049, 2008.
- [12] G. F. H. D. Holtje, *Molecular Modeling*, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1996.
- [13] M. C. F. S. K. H. M. L. Hardell, "Meta-analysis of long-term mobile phone use and the association with brain tumours," *International Journal Of Oncology*, vol. 32, pp. 1097-1103, 2008.
- [14] P. H. H. . D. B. R. B. R. B. D. P. G. T. N. H. M. A. K. V. K. . C. O. C. P. D. T. W. F. V. G. M. Christen, "The GROMOS Software for Biomolecular Simulation: GROMOS05," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 26, pp. 1719-1752, 2005.

## 7 Življenjepis

### OSEBNI PODATKI Kocbek Simon

 Križevci pri Ljutomeru 64, 9242 Križevci pri Ljutomeru 64 (Slovenija)

 041308792

 kocbek@icloud.com

### DELOVNE IZKUŠNJE

- 1/7/2013–28/7/2013 **Praktično usposabljanje**  
Bioplinama proizvodnja d.o.o., Bučečovci (Slovenija)
- 19/6/2017–3/1/2018 **Praktično usposabljanje na polinernem oddelku**  
Kemijski inštitut, Ljubljana (Slovenija)

### KOMPETENCE

**Materni jezik** slovenščina

**Komunikacijske kompetence** - dobre komunikacijske sposobnosti sem pridobil pri študentskem delu pri bolha.cam na oddelku za pomoč uporabnikom

**Organizacijske/vodstvene kompetence** - vodstvene kompetence sem pridobil pri izvajanju projekta molekularne gastronomije na FKKT

**Strokovne kompetence** -raziskovalno delo na polinernem oddelku Kemijskega inštituta

### Digitalne kompetence

#### SAMOVREDNOTENJE

Obdelava informacij	Komunikacija	Ustvarjanje vsebin	Varnost	Reševanje problemov
Samostojni uporabnik	Samostojni uporabnik	Samostojni uporabnik	Samostojni uporabnik	Samostojni uporabnik

Digitalne kompetence - Samooceniševalna lestvica