

Molekyldynamisk undersökning om peptiders
respons på elektriska fält



Ville Järvinen, 38629

Pro gradu-avhandling i fysik

Handledare: prof. Outi Salo-Ahen och prof. Ronald Österbacka

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Åbo Akademi

25 juni 2020

Abstrakt

Förmågan att elektroniskt kunna styra bioaktiva peptiders affinitet till receptorer är av intresse inom biomimetik. I avhandligen undersöktes elektriskt laddade peptiders responser på applicerade elektriska fält med molekylodynamiska metoder. De studerade peptiderna har en sekvens aminosyror som är relevant i Notch-signalerings [1]. Förändringar i konformationer och sekundärstruktur hos peptiderna vid olikriktade applicerade elektriska fält undersöktes. Detta gjordes för att styrka den teoretiska möjligheten att påverka affiniteten till Notch-receptorn och för att erhålla kvalitativa data för peptidernas responser till elektriska fält. Molekylodynamiska metoder valdes för att kunna observera strukturförändringar från jämvikt utan elektriska fält till jämvikt med applicerade positiva eller negativa elektriska fält. Simuleringar utfördes förutom med olikriktade elektriska fält också med tre peptider med olika aminosyrasekvenser (två med laddning och en utan). Strukturförändringar kunde observeras vid olika elektriska fält med hjälp av analys i medelavvikelse i atomkoordinater, vätebindningsanalys och analys av peptidändens avstånd från en fixerad punkt. Peptiden utan laddning visade minimal respons på elektriska fält, vilket antydde lovande resultat som kontrollexperiment. Begränsningarna och bristerna i metoden och utförandet diskuterades för att klargöra pålitligheten hos och reproducerbarheten för simuleringarna.

Innehåll

Inledning	4
1 Bakgrund	5
1.1 Peptider	5
1.2 Modellsystemet	7
1.3 Laddat dubbelskikt	8
2 Molekyldynamik som metod	11
2.1 Grundprincip och tillämpningar	12
2.2 Kraftfält	12
2.2.1 Bundna interaktioner	15
2.2.2 Obundna interaktioner	16
2.3 Simuleringsalgoritmen	17
2.3.1 Initialkoordinater	17
2.3.2 Energiminimering	17
2.3.3 Beräkning av nya koordinater	18
2.3.4 Termostater och barostater	18
2.4 Analysmetoder	19
2.5 Antaganden och förenklingar	20
3 Beräkningar och simuleringar	22
3.1 Den elektriska potentialens avskärmning i det laddade dubbelskiktet .	22
3.2 Homologimodellering	23
3.3 Parametrisering av biotinylrad peptid	26
3.4 LV1-peptid med streptavidin	27
3.5 SV1-peptid med streptavidin	32
3.6 Kontroll-peptid med streptavidin	34

4 Resultat och diskussion	37
4.1 Simuleringar utan elektriska fält	37
4.2 Peptider i elektriska fält med olika styrkor	42
4.3 Peptider i elektriska fält med olika riktning	44
5 Slutsatser och sammanfattning	52
Litteraturförteckning	55
A Figurer	59

Inledning

Avhandlingen undersöker med molekylodynamiska metoder peptiders respons på applicerade elektriska fält. Peptider är kortare proteiner, bestående av tiotals aminosyror, och peptiderna går att syntetisera experimentellt. Beräkningar görs på ett system av peptider som är fästa vid en elektrodyta via biotin, streptavidin och ett självorganiserande monolager. Dessa molekyler har studerats tidigare [2] och är ofta förekommande när proteiner fästs vid ytor. Molekylodynamiksimuleringar utförs på en begränsad del av systemet, nämligen på peptiderna som är bundna till biotinen som i sin tur är bundna till streptavidin-proteinet.

Undersökningen har gjorts inom spetsforskningsenheten *bioelektronisk aktivering av cellfunktioner* (BACE) vid Åbo Akademi, lett av prof. Ronald Österbacka och finansierat av Stiftelsen för Åbo Akademi.

Peptiderna som studeras i avhandlingen har en aminosyrasekvens som efterliknar delen i proteinet Jagged1 som är nödvändig för att binda till Notch-receptorn [1]. Processen är central i Notch-signalering. Peptiderna innehåller också elektriskt laddade aminosyror och hela systemet är i en elektrolytlösning. Hypotesen är att dessa laddade delar av peptiderna kan attraheras till eller repelleras från en elektrodyta med en applicerad spänning. Tre kandidater för peptider för detta syfte undersöks och molekylodynamikstudierna förväntas ge detaljerade beskrivningar om peptidernas strukturer.

Molekylodynamiken ger en bild av hur molekylstrukturerna beter sig såväl vid jämvikt som vid förändrade omständigheter såsom applicerade elektriska fält. Utgående från den erhållna informationen kan experimentella resultat styrkas. Nya kandidater för peptider kan också relativt enkelt och billigt undersökas i molekylodynamiken. Studien görs för att utöka förståelsen för laddade peptiders interaktion med elektriska fält men också för att undersöka streptavidin-peptid-systemets beteende utan elektriska fält.

Kapitel 1

Bakgrund

Elektroder med biologiska lager i kontakt med elektrolyter berör ämnesområdena biokemi, biofysik och elektrokemi. Teorin för de mest relevanta fenomen förklaras i detta kapitel och i simuleringarna implementeras de enligt möjlighet.

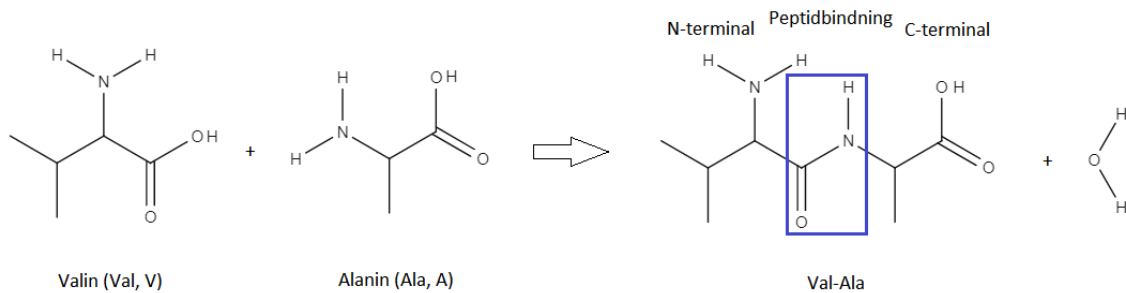
Liknande studier har gjorts tidigare, där laddade peptider på elektroder i lösningar har styrts med elektrisk potential, både experimentellt [3] och med molekylodynamiska metoder [4][5]. Resultaten från dessa studier ger goda förutsättningar för hypotesen i denna avhandling att laddade peptider kan styras med hjälp av applicerad elektrisk potential på elektrodyta och legitimerar därmed användningen av metoden.

1.1 Peptider

Peptiderna som behandlas i avhandlingen utgörs av, för det första, en sekvens som imiterar en del av Jagged1-proteinet som spelar en stor roll i bindningen till Notch-receptorn, för det andra, positivt laddade arginin-aminosyror och för det tredje, biotin i C-terminalen för att binda till streptavidin.

Aminosyror binder till varandra med s.k. peptidbindningar där en aminosyras kväveatom i aminogruppen ($-NH_2$) binder till en annan aminosyras kolatom i karboxylgruppen ($-COOH$). I processen frigörs en väteatom från aminogruppen och en hydroxylgrupp (OH) från karboxylgruppen och dessa bildar tillsammans en vattenmolekyl. En peptid har således oberoende antalet aminosyror alltid en N-terminal (aminogrupp) och en C-terminal (hydroxylgrupp). Se figur 1.1 för illustration av peptidbindningar.

Aminosyror är proteiners byggstenar och kan klassas som polära, opolära, basiska och sura. I fysiologisk pH 7,4 förekommer de basiska aminosyrorna arginin (R), histidin (H) och lysin (K) som positivt laddade aminosyror med laddningen $q = +1e$, där e är elementärladdningen. Däremot förekommer de sura aminosyrorna asparaginsyra (D) och glutaminsyra (E) med en negativ laddning $q = -1e$ [6]. I regel är de fria aminogrupeer som protoneras d.v.s. attraherar en vätekärna och får en extra positiv laddning (NH_3^+) och i motsats deprotoneras karboxylgrupper vilket leder till karboxylatgrupper (COO^-) med negativ laddning. Dessa processer gäller också för peptiders C- och N-terminal.



Figur 1.1: Illustration av hur två aminosyror binder till varandra samt definition av N-terminal och C-terminal.

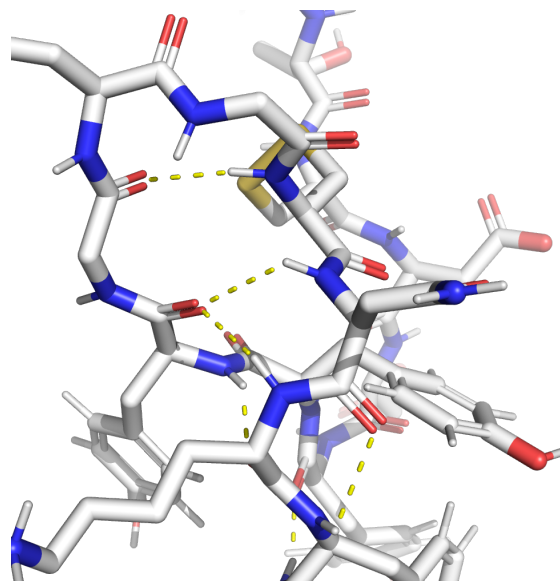
Proteiners strukturer delas in i olika nivåer: primär-, sekundär-, tertiär- och kvartärstruktur. Den specifika aminosyrasekvensen beskriver proteinets primärstruktur medan vikningen beskriver sekundärstrukturen. De mest förekommande sekundärstrukturerna är alfa-helix och betaflak. Tertiärstruktur definieras som veckning av sekundärstrukturer medan kvartärstruktur definieras som tertiärstrukturens vikningar. Peptiderna har en primärstruktur enligt figur 1.2 och sekundärstrukturen kan studeras i simuleringarna. Tre olika peptider med kallade LV1, SV1 och Kontroll skapas utgående från Jagged1-proteinets struktur och studeras med molekylodynamik.

LV1: RRRVRRRVRRRGSGSRVTCDDYYYGFGCNKFCRPRGSGSGSGSGSK – BIOTIN
 SV1: RRRVRRRGSGSRVTCDDYYYGFGCNKFCRPRGSGSGSGSGSK – BIOTIN
Kontroll: SGSGSGSGSGSRVTCDDYYYGFGCNKFCRPRGSGSGSGSGSK – BIOTIN

 Bindningssekvens

Figur 1.2: Primärstrukturen för peptiderna som modelleras. Biotinet är bundet till peptidernas C-terminal.

I proteiner spelar vätebindningar en viktig roll för stabiliteten och strukturen. En vätebindning kan bildas mellan en elektronegativ atom och en annan elektronegativ atom kovalent bundet till en väteatom. Den kovalent bundna väteatomen har en positiv partiell laddning och kan därmed attrahera starkt elektronegativa atomer såsom syre, kväve och fluor. I figur 1.3 syns några av vätebindningarna i bindningssekvensen. Bindningssekvensen innehåller också en disulfidbindning mellan två cystein-aminosyror som hjälper till att hålla strukturen stabil.



Figur 1.3: Vätebindningar (gula streckade linjer) visualiserade i bindningssekvensen för Jagged1-kristallstrukturen (RCSB:ID 4CC1) [1]. Visualiserat i PyMOL [7] med *licorice* representationen.

1.2 Modellsystemet

I molekylodynamiksimuleringarna studeras endast peptiderna som är förankrade i streptavidin-proteinet men resultaten relateras till ett system där streptavidinet är vidare bundet till ett självorganiserande monolager som är fäst via tiolgrupper till en elektrodyta. Det självorganiserande monolagret består av den längre molekylen 11-MUA och den kortare molekylen 3-MPA i ett 1:10 förhållande och är funktionaliserade på en guldyta. Lagret har tidigare studerats och karakteriserats [2][8]. Tjockleken på det självorganiserande monolagret är ca 4 Å och eftersom streptavidinet binder via någon aminogrupp på dess yta till karboxylgruppen på 11-MUA-kedjan befinner sig också streptavidinet ca 4 Å från guldytan. Informationen är viktig för att kunna relatera simuleringarna till elektrodens elektriska fält.

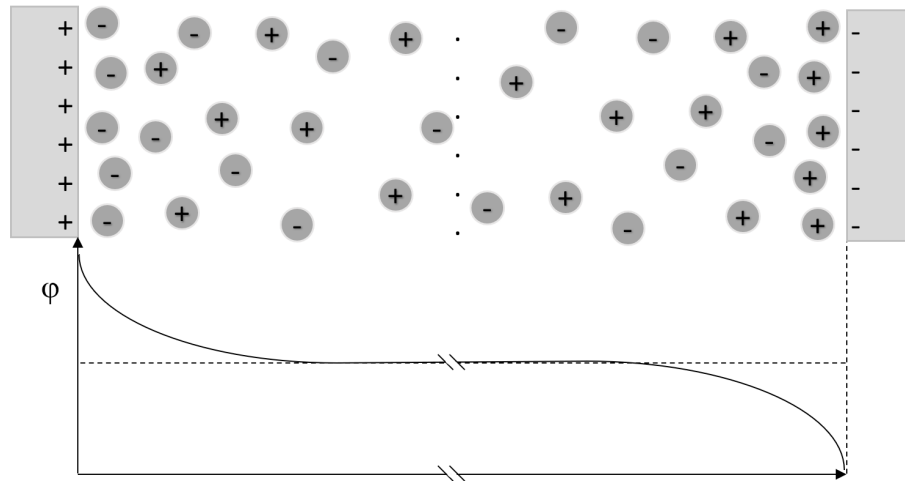
Streptavidinet har en symmetrisk form och en diameter på ca 5 nm. Peptiderna befinner sig teoretiskt alltså på ett avstånd omkring 5 nm – 10 nm från elektrodytan beroende på deras specifika strukturer.

I simuleringarna fixeras streptavidinet på fyra olika ställen undertill för att skapa en så realistisk förenkling som möjligt. Enligt en beräknad yttäthet för 11-MUA på ytan [2] täcker ett streptavidin ca tio 11-MUA-kedjor. Streptavidinet kan binda till en eller flera av dem och för simuleringarna valdes fyra, eftersom streptavidinet har fyra proteinkedjor och antalet gör att streptavidinet hålls stabilare och inte vinklas och vrids i det elektriska fältet.

1.3 Laddat dubbelskikt

Ett laddat dubbelskikt uppkommer när en elektrisk potential appliceras mellan elektroder i en elektrolyt. Den elektriska potentialen skapar en ytladdning på elektrodytan och joner attraheras till eller repelleras från ytan beroende av deras polaritet enligt Coulombs växelverkan [9]. Joner med motsatt polaritet till elektrodytan samlas närmast ytan enligt figur 1.4 och avskärmar därmed en del av elektrodens elektriska potential varmed den snabbt avtar i elektrolyten då avståndet från ytan ökar. Den elektriska potentialen avskärmas alltså effektivt men samtidigt betyder det också att det elektriska fältet är mycket stort i närheten av ytan eftersom den elektriska fältstyrkan fås som den negativa gradienten av den elektriska potentialen enligt

$$\mathbf{E} = -\nabla\phi. \quad (1.1)$$



Figur 1.4: Anjonerna med negativ laddning och katjonerna med positiv laddning samlas vid elektroderna i en vätska och bidrar till den elektriska potentialens avskärmning.

Det laddade dubbelskiktet används till fördel i jonmodulerade organiska fälteffekt transistorer som biosensorer [2]. Alternativt kan det laddade dubbelskiktet användas för att uppnå starka elektriska fält vid funktionaliserade elektrodytor för att manipulera molekylerna på ytan

Det elektriska dubbelskiktet [10] har redan på 1850-talet modellerats av Helmholtz och enligt modellen samlas joner med motsatt laddning vid elektrodytan i ett lager och på så sätt avskärmar den elektriska potentialen så att den avtar linjärt med ökande avstånd från ytan. Senare har bl.a. Gouy och Chapman skapat en modell där lagret som bildas istället är ett diffust lager där den elektriska potentialen avtar exponentiellt. Flera andra modeller har utvecklats men här kommer beräkningar göras med Gouy-Chapmans modell.

Den elektriska potentialens avståndsberoende ges som

$$\phi(x) = \phi_0 e^{-\kappa x}, \quad (1.2)$$

där ϕ_0 är den elektriska potentialen vid elektrodytan i förhållande till långt bort från ytan och

$$\kappa^{-1} = \lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T}{2 \cdot 10^3 N_A e^2 I}} \quad (1.3)$$

är dubbelskiktets karakteristiska tjocklek s.k. Debyes avskärmningslängd [10], där ϵ_0 är permittiviteten i vakuum, ϵ_r är vätskans relativa permittivitet, k_B är

Boltzmanns konstant, T är temperaturen i Kelvin, N_A är Avogadros konstant, e är elementärladdningen och I är jonstyrkan i molaritet M eller ($\frac{\text{mol}}{\text{l}}$). Debyes avskärmningslängd beskriver det avstånd från elektrodytan där den elektriska potentialen sjunkit till $\frac{1}{e}$ av den ursprungliga. Jonstyrkan för en lösning beräknas enligt

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2, \quad (1.4)$$

där c_i är koncentrationen i molaritet M eller $\frac{\text{mol}}{\text{l}}$ för en typ av jon och z_i är jonens laddning där summeringen sker över alla typer av joner i lösningen. I kapitel 3 görs beräkningar på den elektriska potentialens avskärmning.

Kapitel 2

Molekyldynamik som metod

Inom beräkningsfysiken används molekyldynamik som en metod för att studera atomers rörelse som i en större helhet simulerar molekylers samspel under ett tidsintervall. En simulering innebär ett försök att reproducera verkliga händelser i en kontrollerad miljö. I och med att datorernas beräkningskapacitet under de senaste årtiondena växt mycket snabbt har också intresset växt för att använda datorer för att tackla problem som experimentellt kan vara svåra att lösa. Molekyldynamiska simuleringar där hundratusentals atomer alla växelverkar med varandra kräver ett oerhört stort antal parallella beräkningar och snabbhet, vilket dagens processorer och grafikprocessorer har att erbjuda. Det är också tack vare röntgenkristallografi som många kristallstrukturer för proteiner finns tillgängliga och möjliggör därmed modellering av proteiner med exempelvis molekyldynamiska metoder.

Metoden är ett effektivt redskap inom flera naturvetenskapliga områden. Inom det fasta tillståndets fysik kan intresset ligga i att simulera fasta materials kristallstrukturers deformation vid påfrestning medan det inom biokemin exempelvis ligger i biologiska proteinstrukturers mekanismer och funktioner. Inom farmacin används molekyldynamik vid studier av nya läkemedel som ska växelverka med och påverka någon specifik proteinstrukturs funktion.

Detta kapitel beskriver både allmänt och i detalj hur molekyldynamikens algoritmer ser ut. Eftersom arbetet utförs med programpaketet GROMACS [11] fokuseras här på tillämpningarna i just det programpaketet. Utöver detta beskrivs också hurdana resultat som kan förväntas med metoden.

2.1 Grundprincip och tillämpningar

Varje atoms position, hastighet och acceleration i systemet beräknas iterativt med hjälp av Newtons rörelseekvationer. I den mening grundar sig beräkningarna i molekylodynamik på klassisk fysik, men parametrarna som beskriver atomernas växelverknings är ändå erhållna med kvantmekaniska beräkningar. Kapitel 2.2 upplyser vilka växelverknings som beaktas och vilka fysikaliska grunder de bygger på.

Eftersom tidsskalan för molekylodynamiska simuleringar är kort, hundratals nanosekunder till mikrosekunder, sätter det begränsningar på vilka processer som kan upptäckas. Intresset i denna avhandling ligger i peptidernas stabilitet och konformationsändringar som respons på elektriska fält. Dessa responser förväntas ske, och jämvikt förväntas nås, redan efter simuleringstider på tiotals nanosekunder och resultaten i kapitel 4 visar att det delvis stämmer.

Två saker som är viktiga att skilja på är val av programpaket och val av kraftfält. Kraftfält utgör samlingar av accepterade och validerade parametrar för växelverknings mellan atomer. Dessa samlingar är härledda och optimerade för olika ändamål och därför är det nödvändigt att fundera på hurdant system som ska modelleras, vilka molekyler som förekommer och vilka fenomen man vill återskapa. På basis av dessa resonemang och enligt tidigare studier väljs ett lämpligt kraftfält som kan beskriva systemet så bra som möjligt.

När ett lämpligt kraftfält är valt bestäms ett programpaket som kan handskas med kraftfältet i fråga. Exempel på några programpaket är: LAMMPS, Materials Studio, NAMD, GROMACS och AMBER. De tre sistnämnda används ofta för att simulera biologiska system bestående av proteiner, DNA:n och joner. Samtliga simuleringar i denna avhandling är gjorda med kraftfältet GROMOS54a7 [12] i programpaketet GROMACS [11, 13, 14, 15, 16, 17, 18] och resonemanget bakom valet ges senare i kapitel 3.3.

2.2 Kraftfält

Varje atom i en molekyl växelverkar med andra atomer på olika sätt beroende på elektronhöljets uppbyggnad, atomtalet, isotopen o.s.v. Parametrarna i molekylodynamiken som definierar växelverkningsarnas natur representerar dessa

egenskaper hos atomerna.

Ofta används fullständiga kraftfält (eng. all-atom force field) som beaktar molekylernas alla atomer men ifall systemen blir för stora eller processerna för långa kan kraftfält som grupperar atomer till representativa partiklar (eng. coarse-grained force field) användas och på så sätt förenkla systemen. Kraftfältet GROMOS54a7 beaktar alla atomer förutom opolära väteatomer i molekylerna och är således ett typ av kraftfält som grupperar. Det är ändå i klass med andra vanliga kraftfält och lämpar sig bra för simuleringar med peptider och proteiner [12].

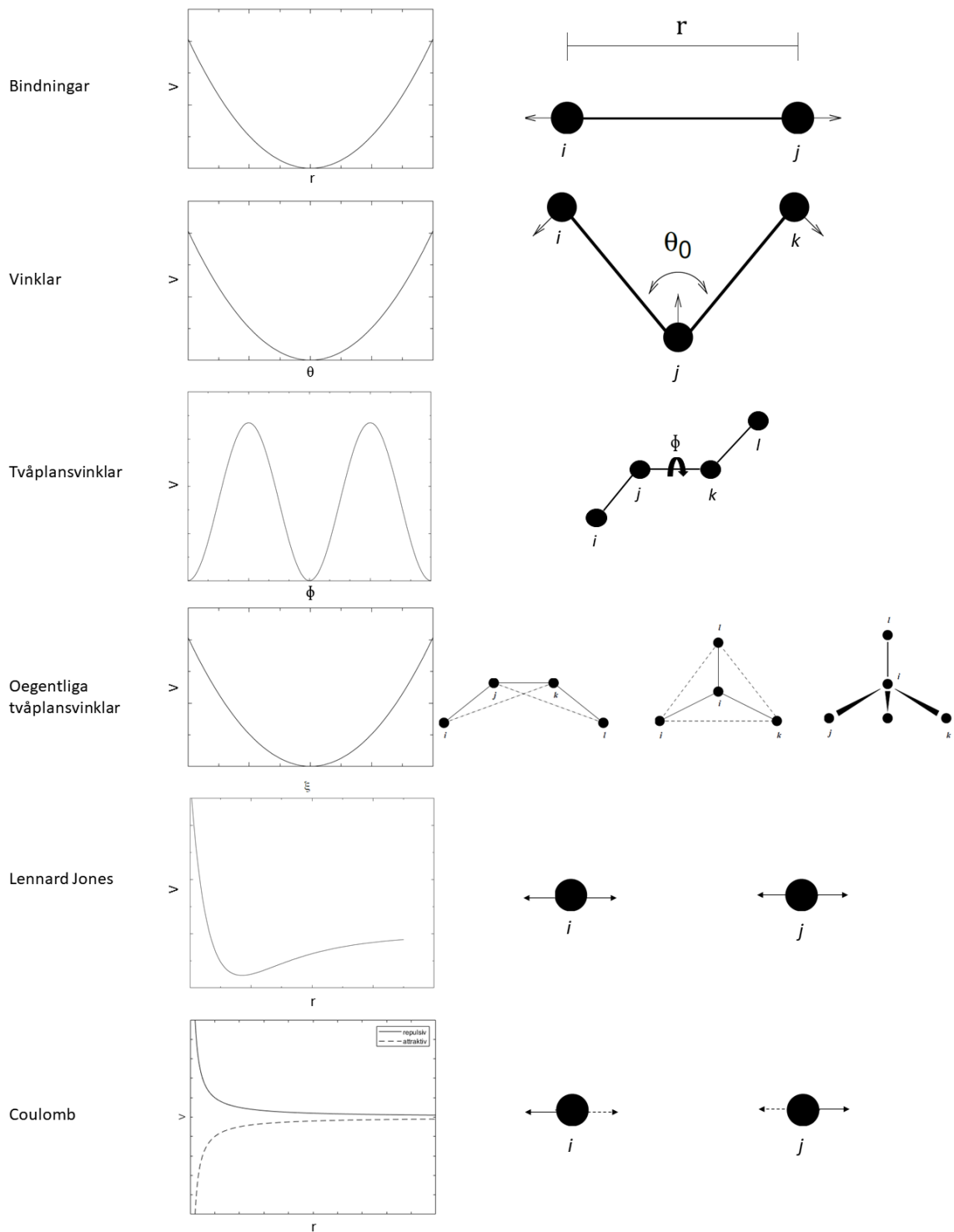
Algoritmen för molekylodynamiksimuleringar [19] löser Newtons rörelseekvationer för ett system av N stycken växelverkande atomer enligt

$$m_i \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} = \mathbf{F}_i, \quad i = 1, \dots, N \quad (2.1)$$

där m_i är den i :te atomens massa, \mathbf{r}_i är den i :te atomens positionsvektor, t är tiden och \mathbf{F}_i är kraften som verkar på den i :te atomen och beräknas som negativa gradienten av en potentialenergifunktion enligt

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N)}{\partial \mathbf{r}_i}. \quad (2.2)$$

Potentialenergifunktionen beskriver varje atoms potentiella energi och beräknas för såväl bundna som obundna interaktioner mellan atomer och behandlas nedan i sektionerna 2.2.1 och 2.2.2. Figur 2.1 visar potentialkurvornas form för varje interaktionstyp och åskådliggör interaktionernas natur.



Figur 2.1: Potentialenergifunktionens form för de olika interaktionerna med illustration av deras natur. Bilderna är tagna ur GROMACS manualen [19].

2.2.1 Bundna interaktioner

Till potentialfunktionen i ekvation 2.2 bidrar varje kovalent bundet atompar, atomerna i och j , med en harmonisk potential

$$V_b(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = \sum_{\text{bindningar}} \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - r_{ij}^0)^2, \quad (2.3)$$

där k_{ij}^b är koefficienten i andragsradsekvationen eller fjäderkonstanten, r_{ij} är avståndet mellan atomerna och r_{ij}^0 är avståndet för potentialens minimum. Värderna för r_{ij}^0 och k_{ij}^b för varje atomtyp finns definierat i systemets topologi som beskriver kraftfältet.

Förutom bindningar beaktas även vinkeln mellan tre bundna atomer, i , j och k , med en harmonisk potential

$$V_v(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = \sum_{\text{vinklar}} \frac{1}{2} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2, \quad (2.4)$$

där k_{ijk}^θ är fjäderkonstanten, θ_{ijk} är vinkeln som atomerna i , j och k bildar och θ_{ijk}^0 är vinkeln vid potentialens minimum. Numeriska värden för k_{ijk}^θ och θ_{ijk}^0 hittas även i topologin för varje tre bundna atomer.

Tvåplansvinklar (eng. proper dihedral) beskriver enligt figur 2.1 torsionen mellan de två planen som atomerna i , j och k samt j , k och l definierar. Potentialen beskrivs som

$$V_t(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = \sum_{\text{torsioner}} k_\phi [1 + \cos(n\phi - \phi_0)], \quad (2.5)$$

där k_ϕ förskjuter den periodiska potentialens amplitud, n är antalet toppar inom intervallet 0 till 2π och ϕ_0 vinkeln för torsionen som motsvarar minimum för potentialen. Vinkeln $\phi = 0^\circ$ motsvarar trans-konfigurationen d.v.s. atomerna i och l på motsatta sidor medan $\phi = 180^\circ$ representerar cis-konfigurationen med i och l på samma sida.

Oegentliga tvåplansvinklar (eng. improper dihedral) definieras enligt figur 2.1 som en vinkel mellan planen som atomerna i , j och k samt j , k och l definierar. Denna typ av potential implementeras för att hålla plana strukturer plana, såsom aromatiska ringar, men också för att undvika att en molekyl övergår till sin spegelbild [19]. Den

harmoniska potentialen för oegentliga tvåplansvinklar

$$V_{otv}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = \sum_{\text{oegentliga tvåplansvinklar}} \frac{1}{2} k_\xi (\xi_{ijkl} - \xi_{ijkl}^0)^2 \quad (2.6)$$

innehåller k_ξ för fjäderkonstanten, ξ_{ijkl} för vinkeln mellan planen och ξ_{ijkl}^0 för jämviktswinkeln.

2.2.2 Obundna interaktioner

Oftast finns det överlägset flest obundna interaktioner eftersom varje atom i princip växelverkar med alla andra atomer i systemet. I praktiken används sfäriska avgränsningar (eng. cut-off radius) för att dramatiskt minska på beräkningsbördan utan att påverka slutresultatet märkbart. Radien för avgränsningen för de obundna interaktionerna brukar vara omkring 1 nm.

Lennard-Jones potential beskriver interaktionen mellan par av obundna atomer och har formen

$$V_{LJ}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = \sum_{i,j} \left[\left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]. \quad (2.7)$$

Parametrarna C_{ij}^{12} och C_{ij}^6 är skilda för varje par av atomtyper. Lennard-Jones potential har sitt ursprung i både Paulis exklusionsprincip (den repulsiva $\frac{1}{r^{12}}$ -termen) och van der Waals-krafter (den attraktiva $-\frac{1}{r^6}$ -termen) [20].

Den andra obundna interaktionstypen är Coulombs växelverkan mellan laddade partiklar. Potentialen beskrivs som

$$V_C(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}. \quad (2.8)$$

I topologifilen för molekylodynamiken har varje atom en s.k. partiell laddning som härstammar från molekylernas elektrondistributioner, som är beräknade med kvantmekaniska metoder för det specifika kraftfältet.

Utöver dessa interaktioner kan både tidsberoende och tidsoberoende elektriska fält appliceras. Vid konstanta och homogena elektriska fält, får varje atom en kraftkomponent till enligt

$$\mathbf{F}_i = q_i \mathbf{E}. \quad (2.9)$$

Dessutom kan positionsbegränsningar (eng. position restraints) definieras för atomer för att begränsa deras rörelse. Detta sker med en harmonisk potential av formen

$$V_{pb}(\mathbf{r}_i) = \frac{1}{2}k_{pb}|\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_i|^2, \quad (2.10)$$

där $|\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_i|$ beskriver atompositionens avlänkning från centret dit atomen begränsas.

Summan av alla dessa komponenter i ekvationerna 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 och 2.8 ger den totala potentialenergifunktionen som i sin tur ger kraften på varje atom enligt ekvation 2.2.

2.3 Simuleringsalgoritmen

2.3.1 Initialkoordinater

Startkoordinater definieras ofta från någon experimentellt bestämd kristallstruktur varefter initialhastigheter för varje atom beräknas med en slumpgenerator som följer Maxwell-Boltzmanns sannolikhetsfördelning för en definierad temperatur. Initialhastigheterna genereras enligt sannolikhetsfördelningen

$$p(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} \exp\left(-\frac{m_i v_i^2}{2k_B T}\right). \quad (2.11)$$

2.3.2 Energiminimering

Energiminimeringen använder sig av en metod där strukturen justeras i potentialenergifunktionens negativa gradients riktning. Som namnet säger minimeras alltså strukturens potentialenergi på basis av det implementerade kraftfältet. Det finns förstas ingen garanti för att det globala minimumet nås men ett lokalt minimum nås i varje fall. I GROMACS algoritmen beräknas nya koordinater med ekvationen

$$\mathbf{r}_{n+1} = \mathbf{r}_n + \frac{\mathbf{F}_n}{\max(|\mathbf{F}_n|)} h_n, \quad (2.12)$$

där \mathbf{r} betecknar alla atomers positioner, n betecknar den senaste iterationen, h_n betecknar den maximala förskjutningen i atompositionerna och $\max(|\mathbf{F}_n|)$ betecknar den maximala kraften som en atom påverkas av vid iterationen n . Kraften beräknas för varje iteration enligt ekvation 2.2 och de nya koordinaterna accepteras ifall $V_{n+1} <$

V_n och då sätts $h_{n+1} = 1.2h_n$, däremot ifall $V_{n+1} \geq V_n$ avvisas de nya koordinaterna och det sätts att $h_n = 0.2h_n$. Iterationerna fortsätter tills den maximala kraften minskar under ett definierat gränsvärde som typiskt ligger på $1000 \frac{\text{kJ}}{\text{mol nm}}$.

2.3.3 Beräkning av nya koordinater

Samlingen rörelseekvationer med de beräknade potentialerna för varje atom löses numeriskt med små tidssteg på $\Delta t = 2\text{fs}$ enligt algoritmen som på engelska kallas *leap-frog integrator*

$$\begin{aligned} \mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\Delta t) &= \mathbf{v}(t - \frac{1}{2}\Delta t) + \frac{\Delta t}{m}\mathbf{F}(t) \\ \mathbf{r}(t + \Delta t) &= \mathbf{r}(t) + \Delta t\mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\Delta t). \end{aligned} \tag{2.13}$$

Systemets tillstånd sparas med regelbundna tidsintervall. Systemet iakttas under en tid och koordinaternas förändring i tiden representerar atomernas rörelsebanor. Systemet når oftast ett jämviktsläge efter initiala förändringar.

Många optimeringar och implementeringar i algoritmerna existerar [21, 22, 23, 24, 25] men behandlas inte i här.

2.3.4 Termostater och barostater

Termostater är implementerade så att systemets temperatur beräknas och atomernas hastigheter skalas om för att justera temperaturen. Däremot fungerar barostaterna så att de beräknar trycket och skalar lådstorleken enligt behov för att hålla trycket konstant. Deras uppgifter är att se till att systemet följer de krav man ställt på ensemblen. Ifall termostat och barostat används simuleras systemet i en isobarisk och isotermisk (NPT) ensemble och ifall endast termostat används simuleras systemet i en kanonisk (NVT) ensemble. NPT ensemblen som används i simuleringarna i avhandlingen motsvarar experimentellt en vätska i en öppen behållare i rumstemperatur.

2.4 Analyismetoder

Atomernas rörelsebanor kan analyseras på flera olika sätt och GROMACS har många inbyggda analyismetoder. VMD [26] är ett mångsidigt program som kan användas vid visualisering av atombanorna och även där finns inbyggda redskap för analyser.

Det kvadratiska medelvärdet för avvikelserna i atomkoordinater även känt som RMSD (eng. root mean square deviation), ger ett värde på den strukturella skillnaden till en referensstruktur, ofta startstrukturen. Strukturen vid varje tidpunkt anpassas till referensstrukturen med minstakvadratmetoden och RMSD-värdet beräknas enligt

$$\text{RMSD}(t) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i |\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i^{\text{ref}}|^2}, \quad (2.14)$$

där $M = \sum_{i=1}^N m_i$ är summan av massorna för alla inblandade atomer, $\mathbf{r}_i(t)$ är den i :te atomens positionsvektor vid tidpunkten t och $\mathbf{r}_i^{\text{ref}}$ är positionsvektorn för den i :te atomen i referensstrukturen. RMSD-värden kan beräknas för ett proteins alla atomer eller så kan exempelvis endast proteinets ryggrad beaktas. Ett proteins ryggrad (eng. backbone) består av den längsta kedjan av kovalent bundna atomer i proteinet och består av kol- och kväveatomer i ordningen N-C-C-N-C-C-N-C-C.

RMSF-värdet (eng. root mean square fluctuation) är ett mått på atompositionernas standardavvikelse från ett medelvärde för atompositionerna och kan ge en uppfattning om vilka aminosyrors atompositioner som fluktuerar mest. RMSF-värdet beräknas enligt

$$\text{RMSF}_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T |\mathbf{r}_i(t_j) - \mathbf{r}_i^{\text{ref}}|^2}, \quad (2.15)$$

där T är den totala tiden.

Analys av avstånd mellan valfria atomer eller grupper av atomer utgör en bra metod och här granskas avståndet mellan botten av streptavidinet och peptidernas N-terminal. Mera exakt är det avståndets y -komponent, som är parallell till det applicerade elektriska fältet. Hur detta avstånd varierar i tid beroende av riktningen av det applicerade elektriska fältet ger en god bild för hur de laddade aminosyrorerna i ändan av peptiderna påverkas.

Analys av antalet vätebindningar inom en viss struktur eller mellan två strukturer är en metod för att studera stabiliteten eller interaktionen mellan olika molekyler,

exempelvis mellan två proteiner. Minskning av antal vätebindningar inom ett protein tyder på att proteinet vecklas ut och ökning tyder på ett mer stabilt protein. Visualiseringsprogramet VMD innehåller ett redskap för vätebindningsanalys för atombanor. Utan att gå in på detaljer på klassificeringen av vätebindningar används kriterierna 4 \AA för avskärningsradien (eng. cut-off radius) och vinkeln 20° för analyserna i VMD.

2.5 Antaganden och förenklingar

En av de mest fundamentala approximationerna i klassisk molekylodynamik är Born-Oppenheimer-approximationen, som säger att atomkärnans rörelse kan beskrivas skilt från elektronerna p.g.a. den stora masskillnaden. Den andra viktiga approximationen är att atomkärnornas rörelser antas kunna beskrivas med Newtons rörelseekvationer. Trots att approximationerna är berättigade i de flesta fall kan det finnas scenarion där den klassiska mekaniken inte räcker till, exempelvis vid högfrekventa oscillationer med lätta väteatomer. Ifall sådana interaktioner är av intresse måste andra metoder användas.

Ett antagande som klassiska kraftfält gör är att beskriva molekylernas laddningsdistributioner med statiska partiella laddningar för varje atom. I verkligheten är molekyler polariserbara vilket innebär att laddningsfördelningarna inte är statiska, utan dynamiska. Det existerar kraftfält för molekylodynamik som inkluderar molekylers polariserbarhet som har visats vara noggrannare modeller i fall där elektriska fält används. Studien som undersökte laddade peptiders respons på elektriska fält [4] använde sig av ett kraftfält som använder polariserbara molekyler i molekylodynamiken. Studien rapporterade svårigheter i att reproducera samma lyckade resultat med klassiska kraftfält. I denna avhandling används ändå klassiska kraftfält med statiska partiella laddningar hos molekylernas atomer. Om valet av kraftfält hittas i kapitel 3.

Eftersom simuleringslådan som definieras har gränssytor till vakuum introduceras periodiska randvillkor för att undvika orealistiska effekter vid gränssytor. Det betyder att simuleringslådan upprepas åt alla håll så att den ursprungliga lådan är omringad av samma system och gränssytor elimineras. Periodiciteten som detta ger upphov till är endast ett problem i mindre system som oftast kan lösas med att göra systemet större. Avskärningsradien för obundna interaktioner kan maximalt vara halva lådans

storlek, för att ingen atom ska ha en interaktion med sin periodiska kopia.

En laddad elektrodyta approximeras med ett konstant och homogent elektriskt fält. Det laddade dubbelskiktet som behandlades i kapitel 1.3 modelleras inte i simuleringarna men diskuteras i slutsatserna.

Kapitel 3

Beräkningar och simuleringar

Beräkningskapacitet för molekylodynamiksimuleringarna erbjöds av *Finnish IT Center for Science (CSC)* och *FGCI project (Finland)*. Beräkningarna gjordes alltså på beräkningsklustren Titan, Dione och Puhti, där beräkningshastigheten kunde ökas 10 – 20-faldigt i jämförelse med en vanlig bordsdator. I detta kapitel förklaras beräkningarnas utförande och resultaten analyseras i nästa.

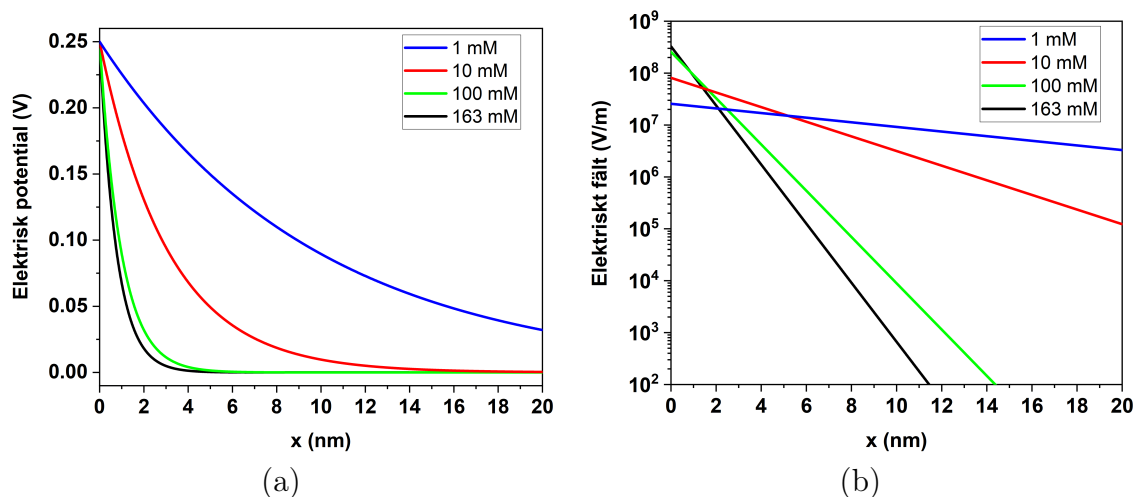
3.1 Den elektriska potentialens avskärmning i det laddade dubbelskiktet

Beroende på elektrolytens jonstyrka avskärmas elektrodens elektriska potential olika starkt. I lösningar med låg jonstyrka sträcker sig den elektriska potentialen längre ifrån elektrodytan jämfört med lösningar med högre jonstyrka. Eftersom det är det elektriska fältet som ska påverka peptiderna, påverkar lösningens jonstyrka starkt det elektriska fältets profil.

Den elektriska potentialens och det elektriska fältets profil beräknas med ett antal olika jonstyrkor för att få en översiktlig bild av storleksordningen på de elektriska fälten. Beräkningarna är gjorda för vatten i rumstemperatur, med $\epsilon_r = 80$ och med en ytpotential på $\phi_0 = 0,25\text{V}$ som motsvarar potentialskillnaden 0.5V mellan två elektroder i kontakt med samma vätska. Tabell 3.1 visar beräknade värden på Debyes avskärmningslängd som funktion av olika jonstyrkor. En typisk jonstyrka för cellodlingsmedium (eng. cell culture media) är $163 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ och inkluderas i beräkningarna.

Tabell 3.1: Beräknade värden på Debyes avskärningslängd vid olika jonstyrkor

I (mM)	λ_D (nm)
163	0,76
100	0,97
10	3,1
1,0	9,7



Figur 3.1: (a) Den elektriska potentialen som funktion av avståndet från elektrodytan och (b) det motsvarande elektriska fältets styrka vid olika jonstyrkor.

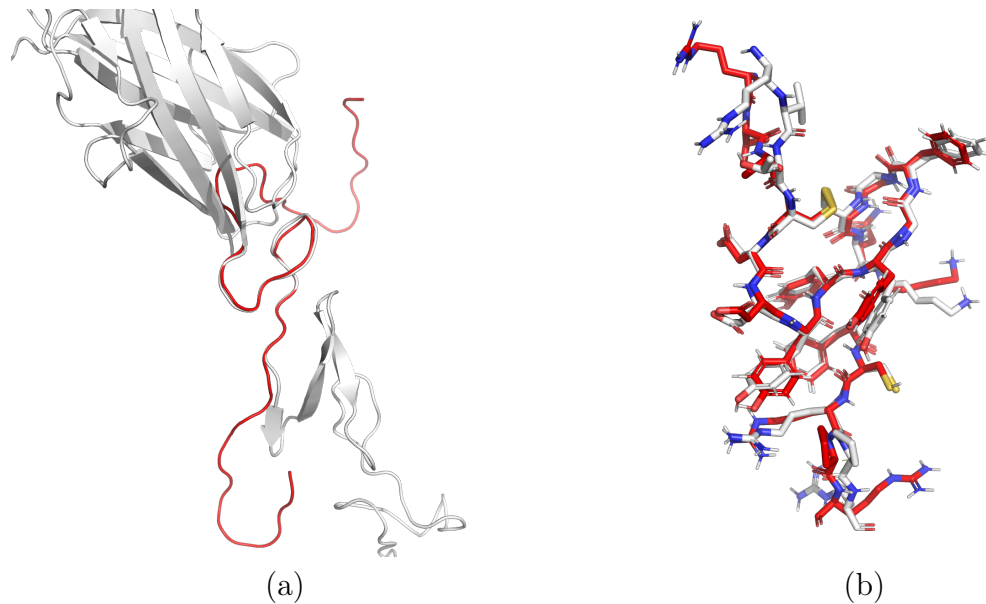
Figur 3.1 visar den elektriska potentialens avskärmning och det elektriska fältets avtagande som funktion av avståndet från elektrodytan, beräknat enligt ekvation 1.2 och 1.1. Enligt modellen sjunker det elektriska fältet snabbare vid högre jonstyrkor men däremot uppnås starkare elektriska fält inom en till två nanometer från ytan. Trots att Debyes avskärningslängd är kort för höga koncentrationer uppnås ändå relativt starka elektriska fält flera nanometer från ytan. Fältstyrkan $4 \cdot 10^2 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ vid 10 nm för cellodlingsmedium är väldigt svagt och kan inte förväntas påverka laddade grupper på peptider märkbart i rumstemperatur. Däremot uppnås med lägre jonstyrkor högre elektriska fält som kunde tänkas vara tillräckligt starka. Figuren relateras till senare, i samband med resultaten i kapitel 4.3.

3.2 Homologimodellering

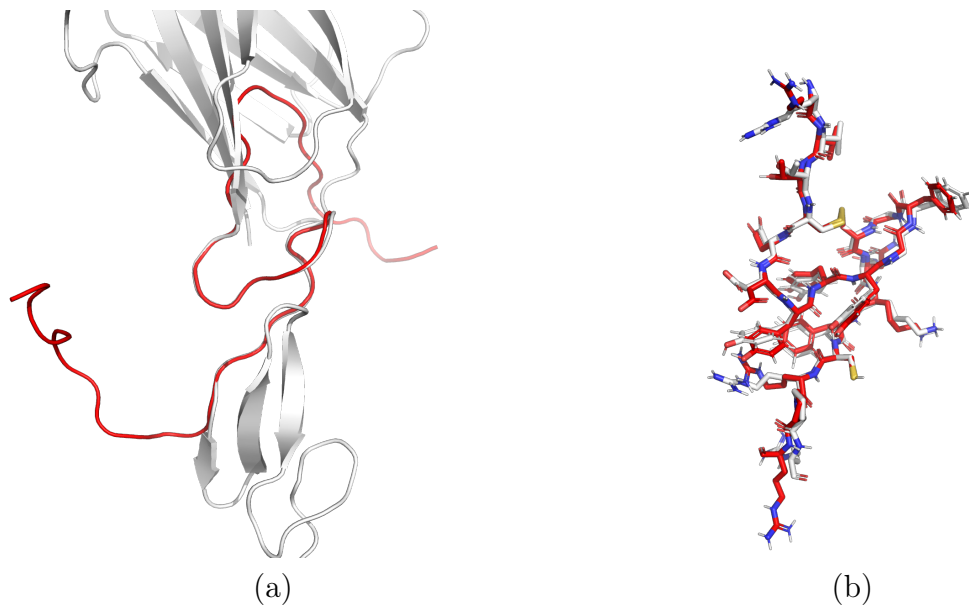
Homologimodellering innebär i kort att skapa en tredimensionell modellstruktur för ett protein (vars struktur man inte känner till) på basis av en känd struktur för ett

relaterat (homologt) protein. Det okända proteinets sekvens inpassas med det kända proteinets sekvens. Även om sekvenserna har olikheter, antas de tredimensionella strukturerna av homologa proteiner vara likadana. Ju mer identiska sekvenserna är, desto pålitligare är modellstrukturen. Sekvensinpassningen används alltså för att bygga upp koordinaterna för en tredimensionell struktur för ett protein med okänd struktur på basis av den tredimensionella strukturen för ett modellprotein.

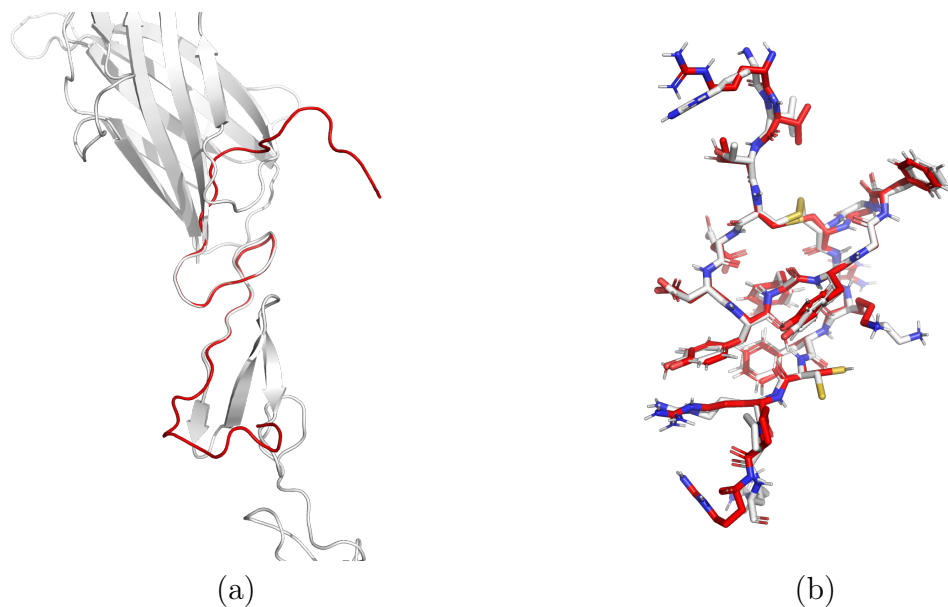
Peptidernas sekundära struktur med vikningar och disulfidbindningar skapas enligt Jagged1-strukturen (RCSB:ID 4CC1) [1]. Programpaketet Modeller [27] användes för detta syfte och de skapade strukturerna granskades och hade mycket liknande konformationer vid bindningssekvensen som är identisk med en del av Jagged1-proteinets aminosyrasekvens. Resten av aminosyrasekvensen (figur 1.2) är olik mellan peptiderna och Jagged1-proteinet. Figurerna 3.2, 3.3 och 3.4 visar slutresultaten och likheten mellan peptiderna och Jagged1-proteinet.



Figur 3.2: LV1-peptidens struktur (röd) efter utförd homologimodellering lagt ovanpå Jagged1-proteinet (vit) för att jämföra likheten. Visualiserat med PyMOL med (a) *cartoon* representationen och (b) *licorice* representationen. Observera att i (b) visualiseras endast bindningssekvensen för peptiden och motsvarande sekvens för Jagged1-proteinet.



Figur 3.3: SV1-peptidens struktur (röd) efter utförd homologimodellering lagt ovanpå Jagged1-proteinet (vit) för att jämföra likheten. Observera att i (b) visualiseras endast bindningssekvensen för peptiden och motsvarande sekvens för Jagged1-proteinet.



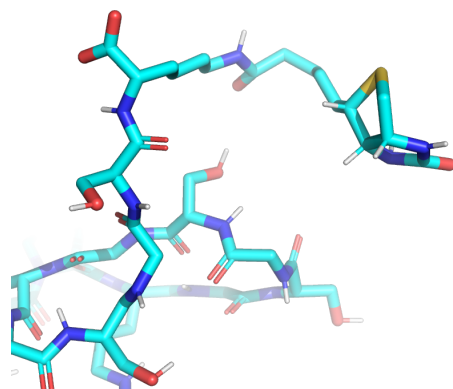
Figur 3.4: Kontroll-peptidens struktur (röd) efter utförd homologimodellering lagt ovanpå Jagged1-proteinet (vit) för att jämföra likheten. Observera att i (b) visualiseras endast bindningssekvensen för peptiden och motsvarande sekvens för Jagged1-proteinet.

3.3 Parametrisering av biotinylerad peptid

De vanligaste kraftfälten har vad som behövs för att simulera aminosyror, joner och olika lösningsmedel. Ifall en molekyl som ska simuleras är ny för kraftfältet måste interaktionsparametrar för molekylerna genereras för att molekylodynamik ska kunna utföras. Det existerar automatiserade system för parametrisering som exempelvis *Automated Topology Builder* (ATB) [28]. ATB ger som output en topologifil på basis av en koordinatfil. För att simulera främmande molekyler i lösning med proteiner är det enkelt att följa instruktioner [29] men när den främmande molekylerna är kovalent bundna till proteinet är uppgiften mer krävande och instruktioner eller exempel är svåra att hitta.

Peptidens C-terminal består av lysin och biotinet är kovalent bundet med en peptidbindning från biotnets karboxylgrupp till lysinets aminogrupp i sidokedjan. GROMACS kommandot `gmx pdb2gmx` konverterar en koordinatfil för peptiden till en topologifil för kraftfältet. Kommandot kan inte bygga topologin för okända molekyler. För att erhålla biotin-lysin parametrar kontaktades forskare som beräknat med biotin i simuleringar tidigare. Ett stort tack till dr Torsten John, vid Leibniz Institute of Surface Engineering, som delade med sig en topologifil innehållande interaktionsparametrar för en biotinylerad peptid från en av hans studier [30]. De erhållna interaktionsparametrarna var i format för kraftfältet GROMOS54a7 [12]. Därtill behövdes kraftfältets parametrar kompletteras med atomtyperna i biotinet och filerna för ett modifierat kraftfält för GROMOS54a7 hämtades från ATB [28].

Topologifilen innehöll det som behövdes men parametrarna måste manuellt omorganiseras för att skapa topologin för biotinylerat lysin eftersom den tidigare studien involverade biotinylerat glycin. Interaktionsparametrarna överfördes till peptidens topologifil och justerades för att gälla rätt atomer. När topologifilen efter några försök kunde lyckat användas i simuleringar i testningssyfte kunde det gås vidare till att inkludera streptavidinet. Figur 3.5 visar strukturen för biotinet bundet till lysinet.



Figur 3.5: Strukturen för biotinet bundet med peptidbindning till lysinets sidokedja.

3.4 LV1-peptid med streptavidin

Streptavidinets struktur är taget enligt strukturen (RCSB:ID 1SWK) [31] och har valts p.g.a. det faktum att biotinmolekyler var tillgängliga i alla fyra bindningsfickorna. Den biotinylerade peptiden LV1 lades in i stället för två av streptavidinets biotin med hjälp av PyMOL. Energiminimering utfördes för att slippa överlappningar. I simuleringsprocessen följdes Justin A. Lemkuls instruktioner för utförandet av molekylodynamiksimuleringar [29].

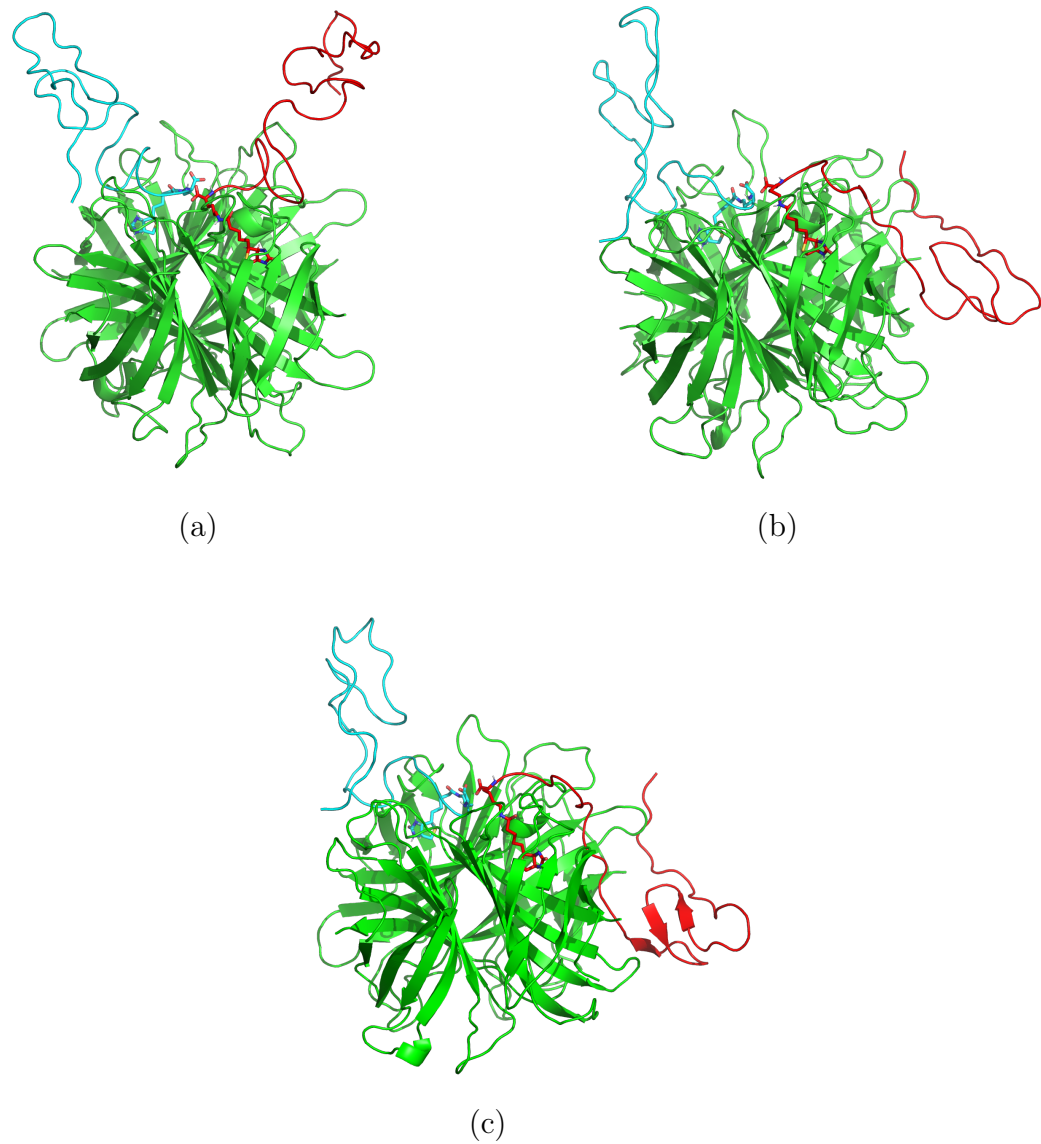
Storleken av lådan som definierar periodiska randvillkoren definierades till en kub med dimensionerna 13x13x13 nm med kommandot *gmx editconf*. Vattenmolekyler tillsattes med *gmx solvate* och eftersom systemets nettoladdning låg på +18e tillsattes 18 negativa kloridjoner med kommandot *gmx genion*. Jonerna ersätter slumpmässigt valda vattenmolekyler och det är i enlighet med normala protokoll för molekylodynamiksimuleringar eftersom algoritmerna kan falla ifall totalladdningen är olik noll. Nu består systemet av totalt ca 200 000 atomer varav ungefär 97% är vatten. I detta skede kördes en energiminimering igen med jonerna och vattenmolekylerna för att säkerställa att själva simuleringen kan starta stabilt och att inga krafter är onaturligt stora p.g.a. t.ex. överlappande atomer. Energiminimeringen slutade när systemets största kraft mellan två atomer var under $1000 \frac{\text{kJ}}{\text{mol nm}}$.

Till näst utfördes ekvibrering bestående av 100 ps i en kanonisk ensemble (NVT) och

Ville Järvinen

av 100 ps i isobarisk och isotermisk ensemble (NPT). Algoritmen för ekvibreringen fixerar alla atomer med positionsbegränsningar förutom vattenmolekylerna och jonerna för att jämna ut endast deras rörelser. Efter ekvibreringen startades den riktiga simuleringen och kördes i 25 ns i en NPT ensemble med termostat och barostat. Simuleringen förlängdes också med ytterligare 50 ns

En viktig detalj i simuleringarna är att streptavidinet är positionsbegränsat, på fyra atomer undertill på proteinet. Begränsningarna är applicerade på fyra kväveatomer i fria aminogrupeer för att imitera hur proteinet binder vid det självorganiserande monolagret. Figur 3.9 visar var dessa fyra atomer är. Figur 3.6 visar systemet vid olika simuleringstider utan applicerade elektriska fält. Figur 3.6 visar också betaflaksekundärstrukturen för peptiden som visas som röda pilar i strukturen. Peptiderna kan också ses ha vikit sig mot streptavidin-proteinet i simuleringarna utan elektriska fält.

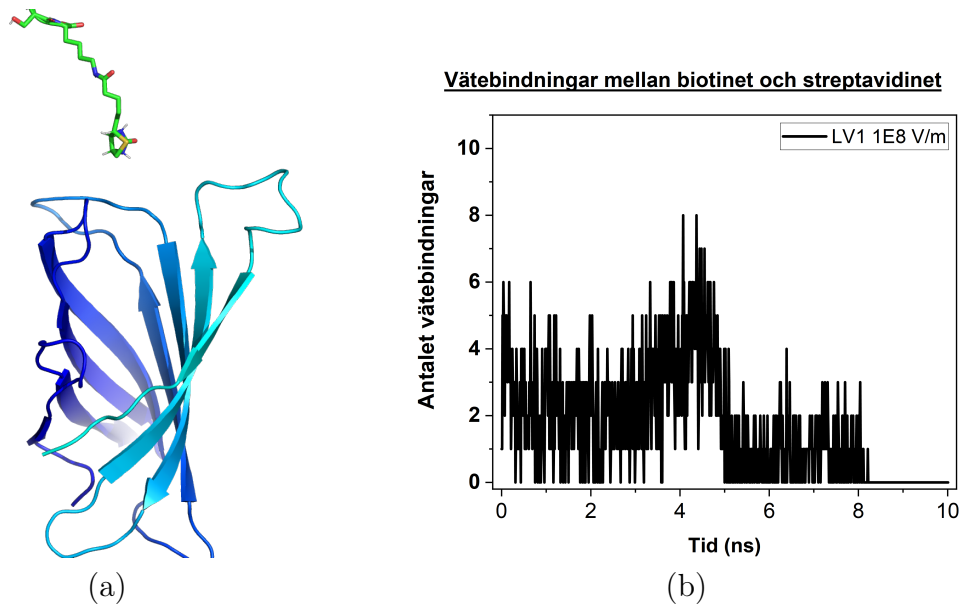


Figur 3.6: LV1-peptidernas (blå, röd) struktur med streptavidinet (grön) (a) i början, (b) efter 25 ns och (c) efter 75 ns. Peptidernas struktur i början är resultatet från homologimodelleringen i en energiminimerad form. Vattenmolekylerna och jonerna är inte visualiserade för tydlighetens skull. Visualiserat i PyMOL.

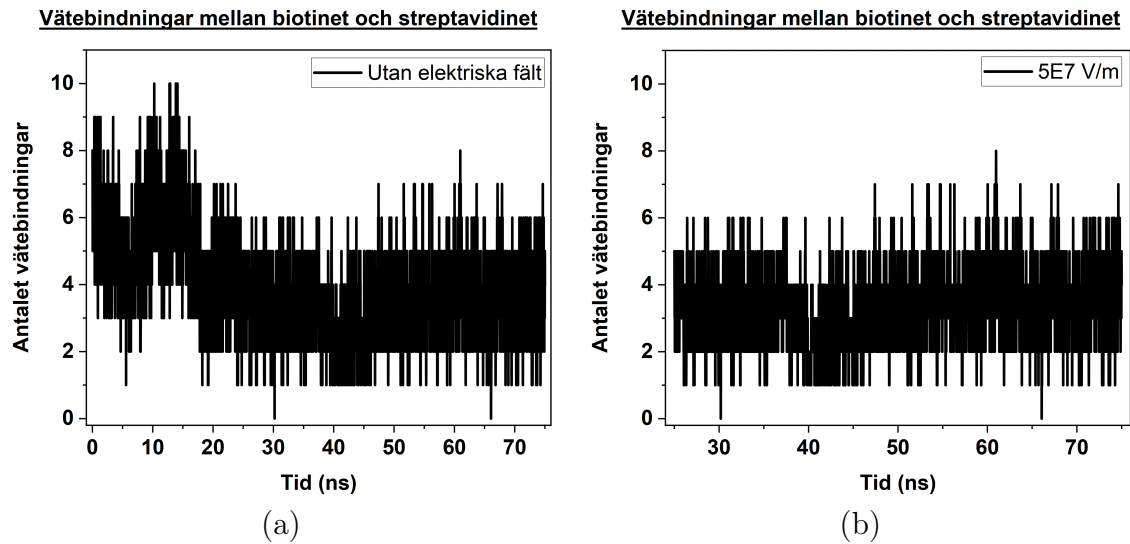
Från strukturen vid 25 ns startades simuleringar med olika fältstyrkor: $10^8 \frac{\text{V}}{\text{m}}$, $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$, $10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$, $10^6 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ och $10^5 \frac{\text{V}}{\text{m}}$. Fältstyrkan på $10^8 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ ledde snabbt till lossnande av biotinet från streptavidinet och fältstyrkan utgör därmed en övre gräns för en applicerad fältstyrka. Figur 3.7 visar hur vätebindningarna mellan biotinet och streptavidinet sjunker till noll och kraften som det elektriska fältet utsätter peptiden för resulterar i biotinet lossnande. Förutom diskussionen i detta kapitel används

simuleringen inte i analyserna.

Streptavidin-biotin komplexet är mycket studerat och det finns data på styrkan av deras interaktion med varandra. En studie visade experimentellt med AFM mätningar att vid dragkrafter över ca 150 pN lossnar biotinet [32]. I en annan studie där samma fenomen undersöktes [33] användes bland annat molekylodynamiska metoder och brottstyrkan beräknades att vara i storleksordningen 200 pN. Nettokraften som det elektriska fältet utgör på den laddade peptiden kan uppskattas enligt ekvation 2.9 till $F = 10e \cdot 10^8 \frac{V}{m} = 160 \text{ pN}$ vid ett elektriskt fält på $10^8 \frac{V}{m}$ och 80 pN vid $5 \cdot 10^7 \frac{V}{m}$ och eftersom separering skedde vid den högre fältstyrkan men inte den lägre har biotinet motsvarande bindningsaffinitet till streptavidinet i simuleringarna som i andra studier.

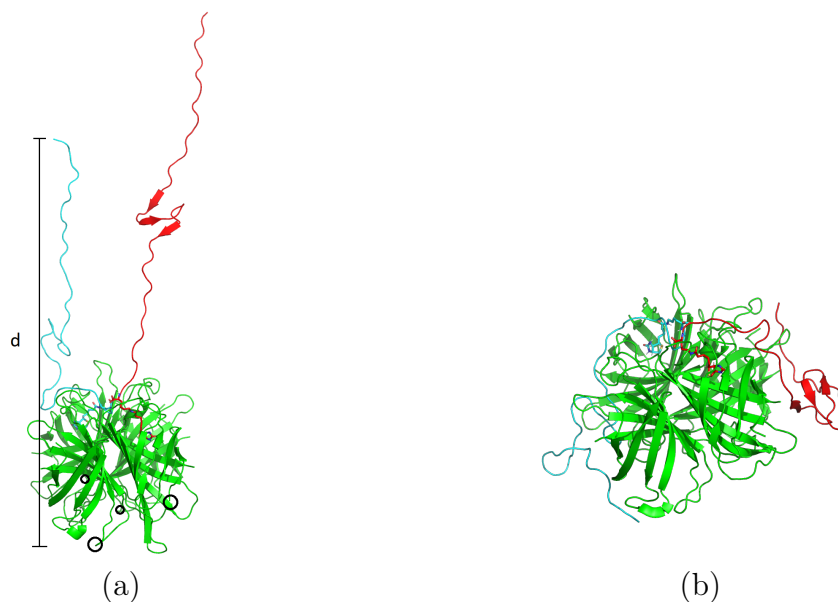


Figur 3.7: (a) Biotinet på väg ut ur sin bindningsficka i streptavidinet som resultat av för starka elektriska fält. Visulerat i PyMOL utan streptavidinets andra tre proteinkedjor samt utan vattenmolekyler och joner för tydlighetens skull. (b) Antalet vätebindningar mellan streptavidinet och biotinet som går till noll.



Figur 3.8: Antalet vätebindningar mellan biotinet och streptavidinet i en stabilare simulering i systemet med SV1-peptiderna (a) utan elektriska fält och (b) med fältstyrkan $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$.

Resultaten och analyserna från de 25 ns långa simuleringarna visas i resultatkapitlet 4.2. På basis av dessa resultat valdes fältstyrkan $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ för att användas i resten av simuleringarna där fältstyrkans riktning varieras och simuleringarna varar dubbelt så lång tid. Med samma starstruktur som tidigare simuleringar i olika fältstyrkor simulerades nu 50 ns med fältstyrkorna $\pm 5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$, d.v.s. två olika simuleringar med olikriktade elektriska fält. Figur 3.9 visar hur peptiderna sträcker ut sig respektive böjer sig ner längs med y-riktningen parallellt med fältstyrkan. Figuren visar också y-komponenten av avståndet mellan botten av streptavidinet till peptidens N-terminal i den laddade ändan, avståndet d används senare i analysen i resultatdelen.



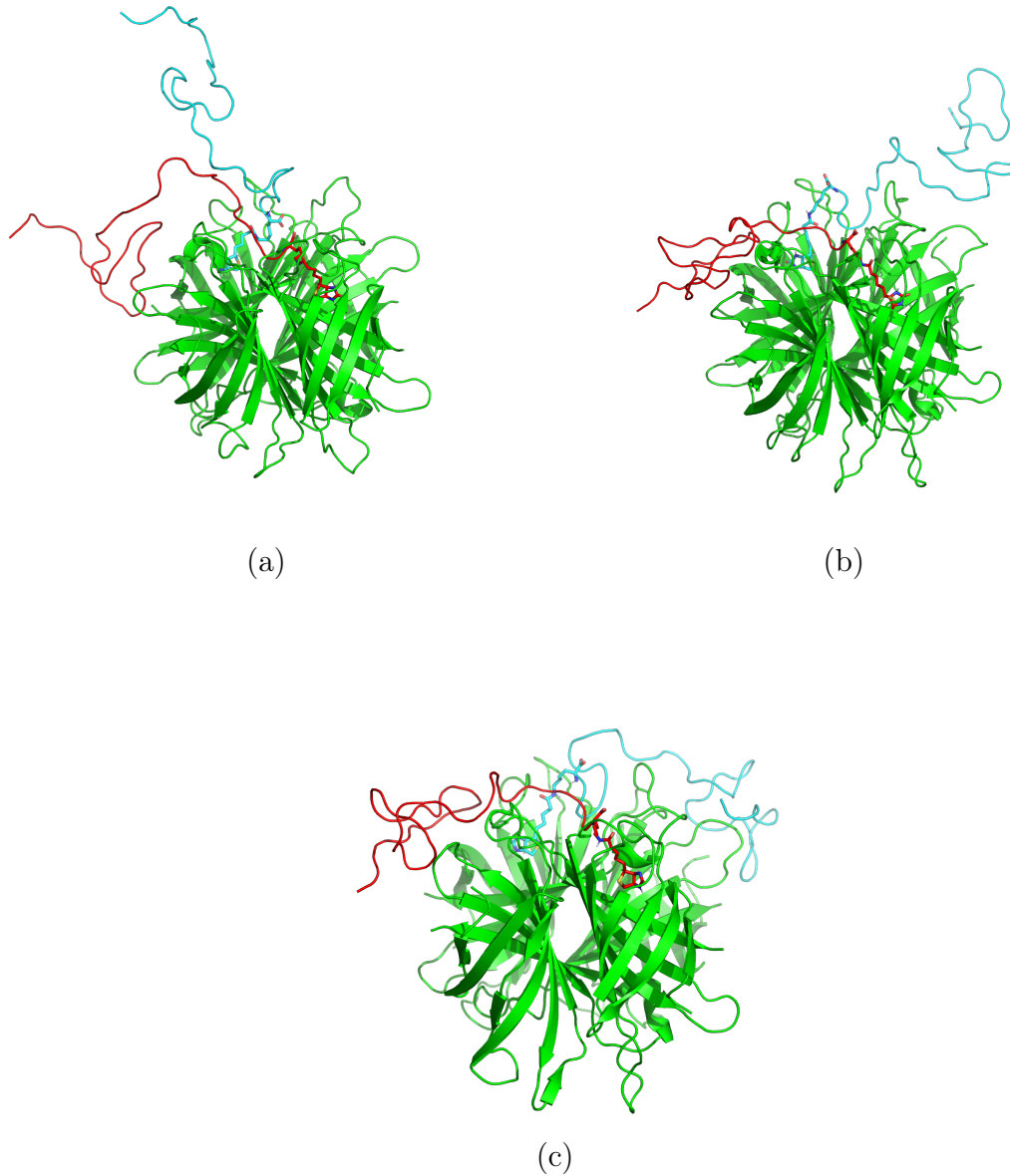
Figur 3.9: LV1-systemets struktur efter 50 ns simulering med fältstyrkan (a) $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ och (b) $-5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$. De svarta ringarna indikerar var på streptavidinet positionsbegränsningarna är applicerade och avståndet d är y-komponenten som är parallell med det applicerade elektriska fältet.

3.5 SV1-peptid med streptavidin

För att byta ut LV1-peptiderna till SV1-peptider med färre laddade aminosyror kunde en hel del av det som gjorts med tidigare systemet utnyttjas. Topologin för den nya peptiden byggdes om och strukturen där de nya biotinylerade peptiderna är i streptavidinets bindningsfickor skapades. För SV1-peptiden utan biotin kunde topologin skapas med `gmx pdb2gmx` kommandot. LV1-peptidens topologi för biotin- och lysindel kopierades över till SV1 peptidens topologi och justerades för att atomindexen skulle vara korrekt. Här användes ett skript [34] för att numrera om atomerna. På detta sätt skapades filen `sv1.itp` som inkluderas i systemets topologifil `topol.top`. PyMOL användes för att binda biotinet till peptiden och således skapa koordinatfilerna för biotinylerade peptiderna. Peptiderna sattes in i streptavidinet med att överlappa peptidernas biotin med biotinet i streptavidinets kristallstruktur, detta också med hjälp av PyMOL.

Proceduren för att simulera de två SV1-peptiderna med streptavidinet var samma som för LV1 peptiden och beskrivs noggrannare ovan. I korthet bestod proceduren av energiminimering i vakuum, tillsättande av vattenmolekyler och 12 negativt laddade

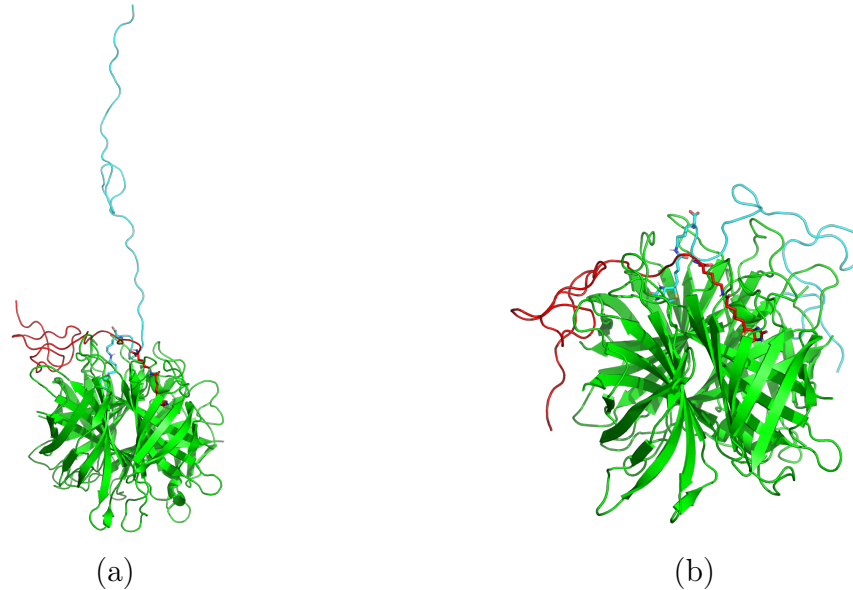
kloridjoner för att neutralisera systemet, enegiminimering i vattenlösning, 100 ps NVT och 100 ps NPT ekvibrering efterföljt av simulering under 25 ns. Strukturerna visulaiseras i figur 3.10. Motsvarande som tidigare förlängdes denna simulering efteråt med 50 ns.



Figur 3.10: SV1-peptidernas (blå, röd) struktur med streptavidinet (grön) (a) i början, (b) efter 25 ns och (c) efter 75 ns. Peptidernas struktur i början är resultatet från homologimodelleringen i en energiminimerad form.

Efter simuleringen utan elektriska fält applicerades ett elektriskt fält i y-riktning med styrkan $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ och systemet simulerades i 50 ns. Från samma utgångspunkt utfördes också en 50 ns simulering med fältstyrkan i negativ y-riktning. Resultaten

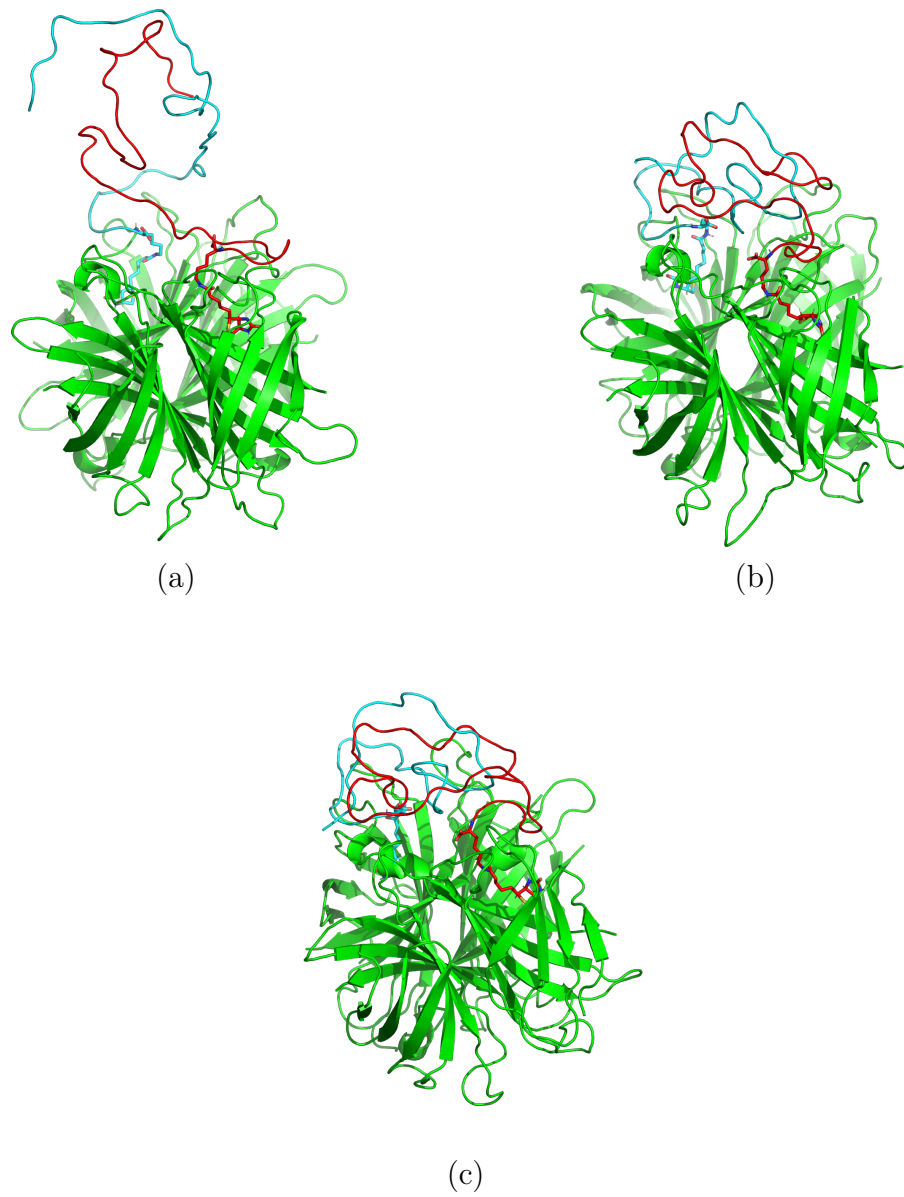
med jämförelse och analys hittas i kapitel 4.3 och strukturerna visualiseras i figur 3.11.



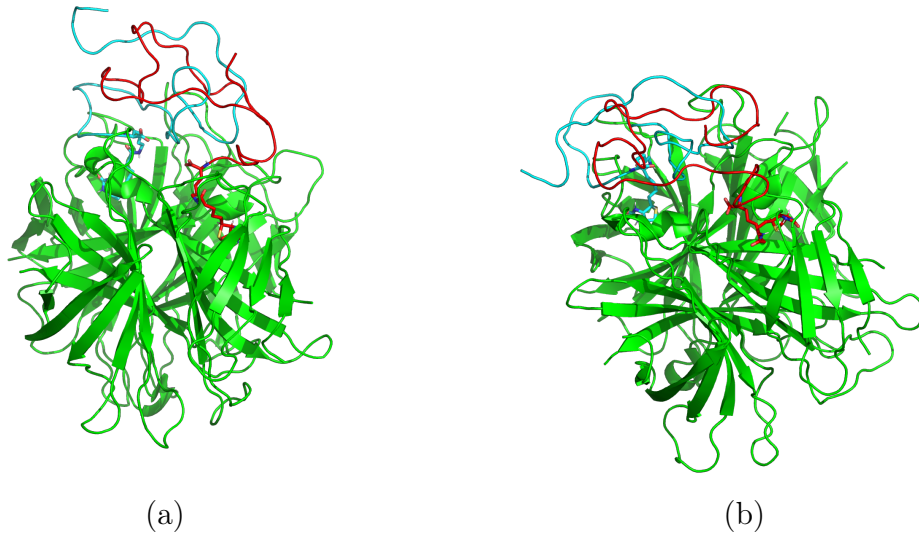
Figur 3.11: SV1-systemets struktur efter 50 ns simulering med fältstyrkan (a) $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ och (b) $-5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$.

3.6 Kontroll-peptid med streptavidin

Procedurerna för att byta ut peptiderna och för simuleringarna är identiska med beskrivningen i kapitlet 3.5 ovan. Systemet består nu av streptavidin med två biotinylerade Kontroll-peptider och proceduren igen likadan som i den tidigare sektionen, med exceptionen av att inga joner tillsattes p.g.a. systemet var neutralt. Figuren 3.12 visar strukturerna vid olika tidpunkter i simuleringarna utan elektriska fält och figur 3.11 visar hur elektriska fälten påverkar kontrollpeptiderna medan resultaten och analyser hittas i kapitel 4.3. Det är tydligt att Kontroll-peptiderna utan laddningar inte påverkas av det elektriska fältet.



Figur 3.12: Kontroll-peptidernas (blå, röd) struktur med streptavidinet (grön) (a) i början, (b) efter 25 ns och (c) efter 75 ns. Peptidernas struktur i början är resultatet från homologimodelleringen i en energiminimerad form.



Figur 3.13: SV1-systemets struktur efter 50 ns simulering med fältstyrkan (a) $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ och (b) $-5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$.

Kapitel 4

Resultat och diskussion

I detta kapitel har resultaten från simuleringarna samlats. Resultat och analyser diskuteras och tolkas här nedan för att sedan i avslutningen sammanfattas och vidareutvecklas. För att studera både hela peptiders och peptidernas bindningssekvensers stabilitet används RMSD-analys, RMSF-analys och vätebindningsanalys. Antalet vätebindningar mellan peptiderna och streptavidinet analyseras för att undersöka deras interaktion och systemets konvergering mot jämvikt. Peptidändens avstånd från undertill på streptavidinet mäts också för att få ett mått på hur den laddade peptidänden reagerar på elektriska fält som funktion av simuleringstid.

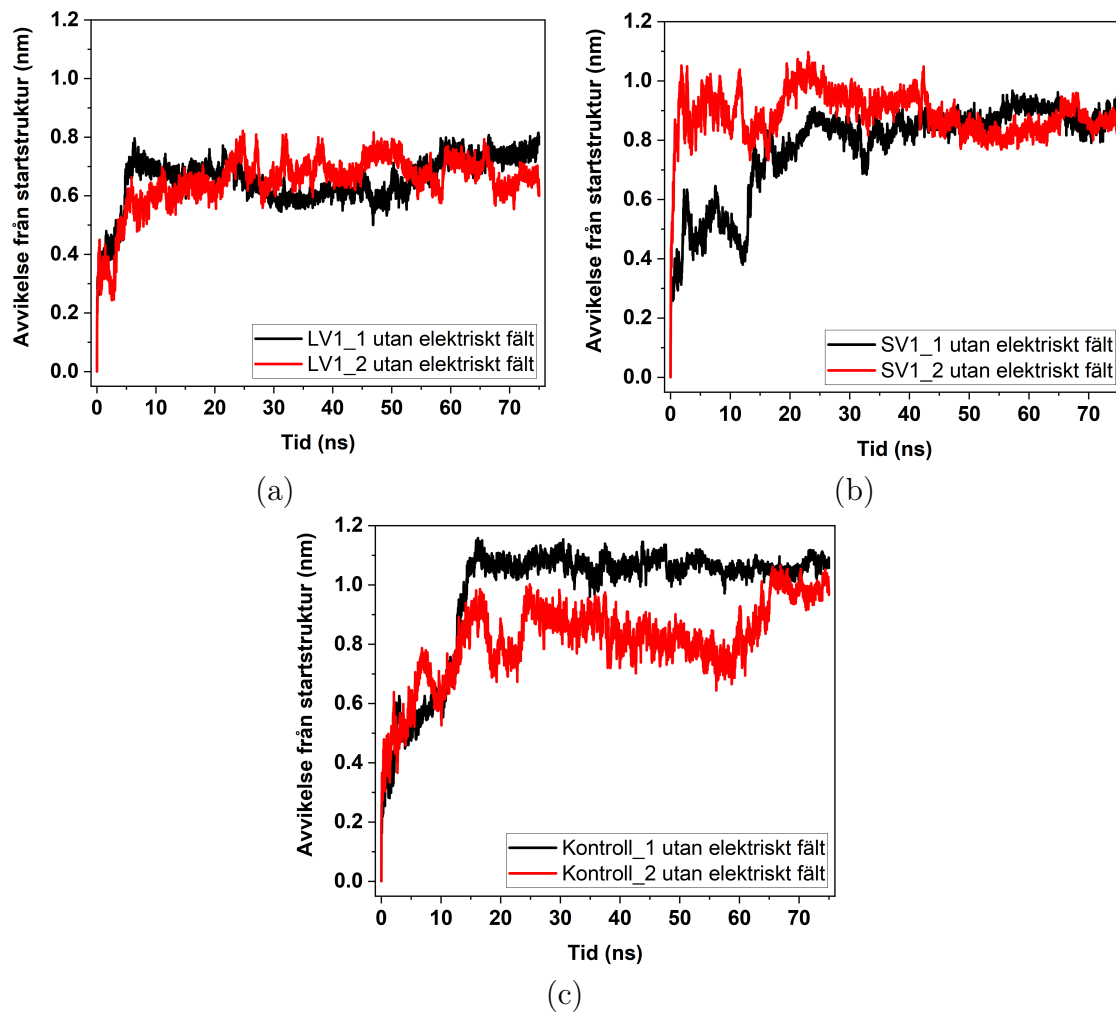
4.1 Simuleringar utan elektriska fält

För varje enskilt system har 75 ns av simulering utan elektriskt fält utförts. Det visar sig att datan som dessa simuleringar har att ge är minst lika mycket värt som datan från simuleringarna med elektriska fält.

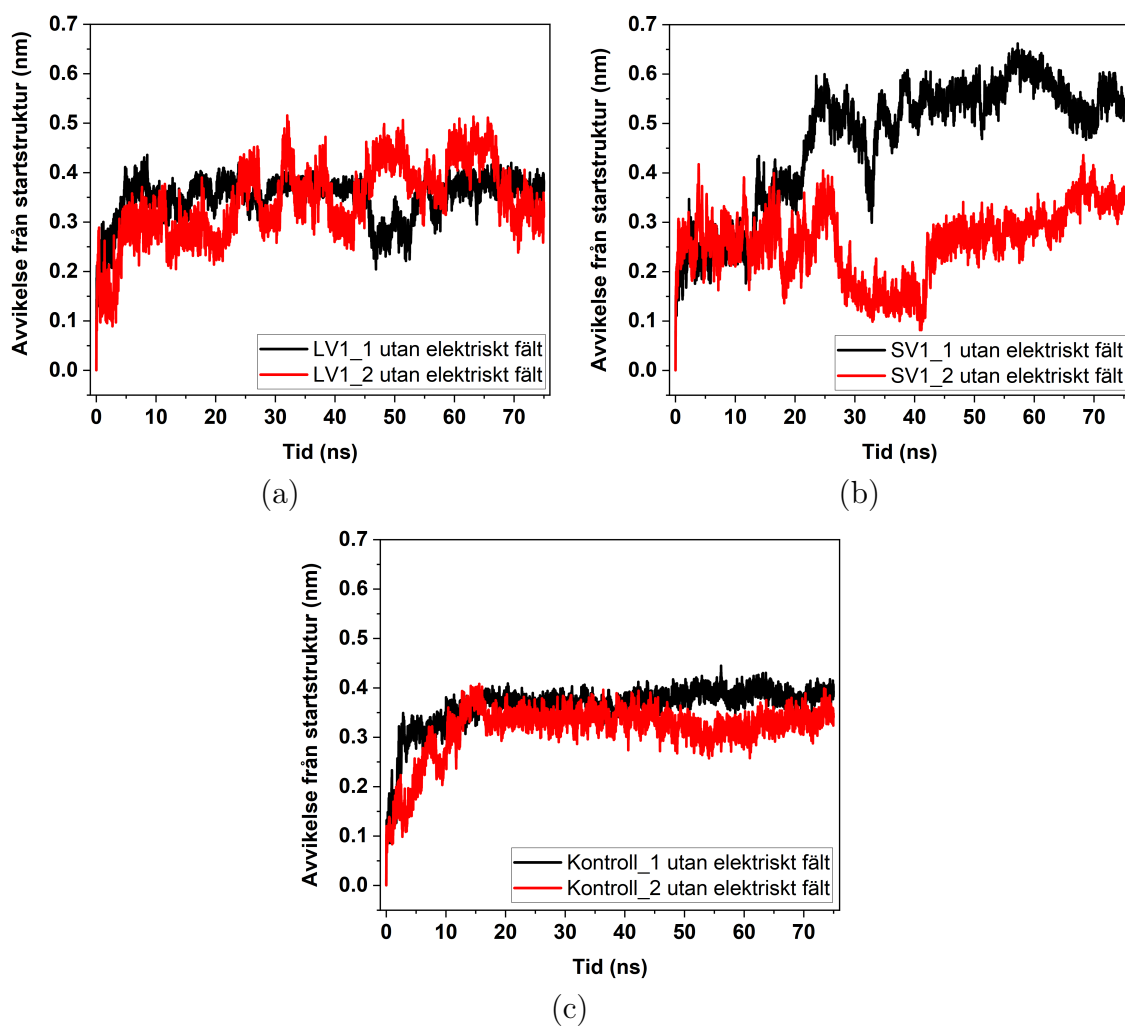
Figur 4.1 visar avvikelserna från startstrukturen för peptidens ryggrad och RMSD-värdena är relativt stora men peptidernas flexibilitet leder till stora RMSD-värden och stora fluktuationer. RMSD-analyserna (figur 4.1 och figur 4.2) på peptiderna visar också att den initiala 25 ns simuleringen verkar lämplig och tillräckligt lång för att de initiala förändringarna i konformationer ska hinna hända. Alla tre system visar ett rätt så stabilt RMSD-värde efter 25 ns. RMSD-värdet för peptidernas bindningssekvens visar också liknande stabilitet efter ca 25 ns, förutom för SV1_2-

peptiden i figur 4.2 som har stora fluktuationer i avvikelserna.

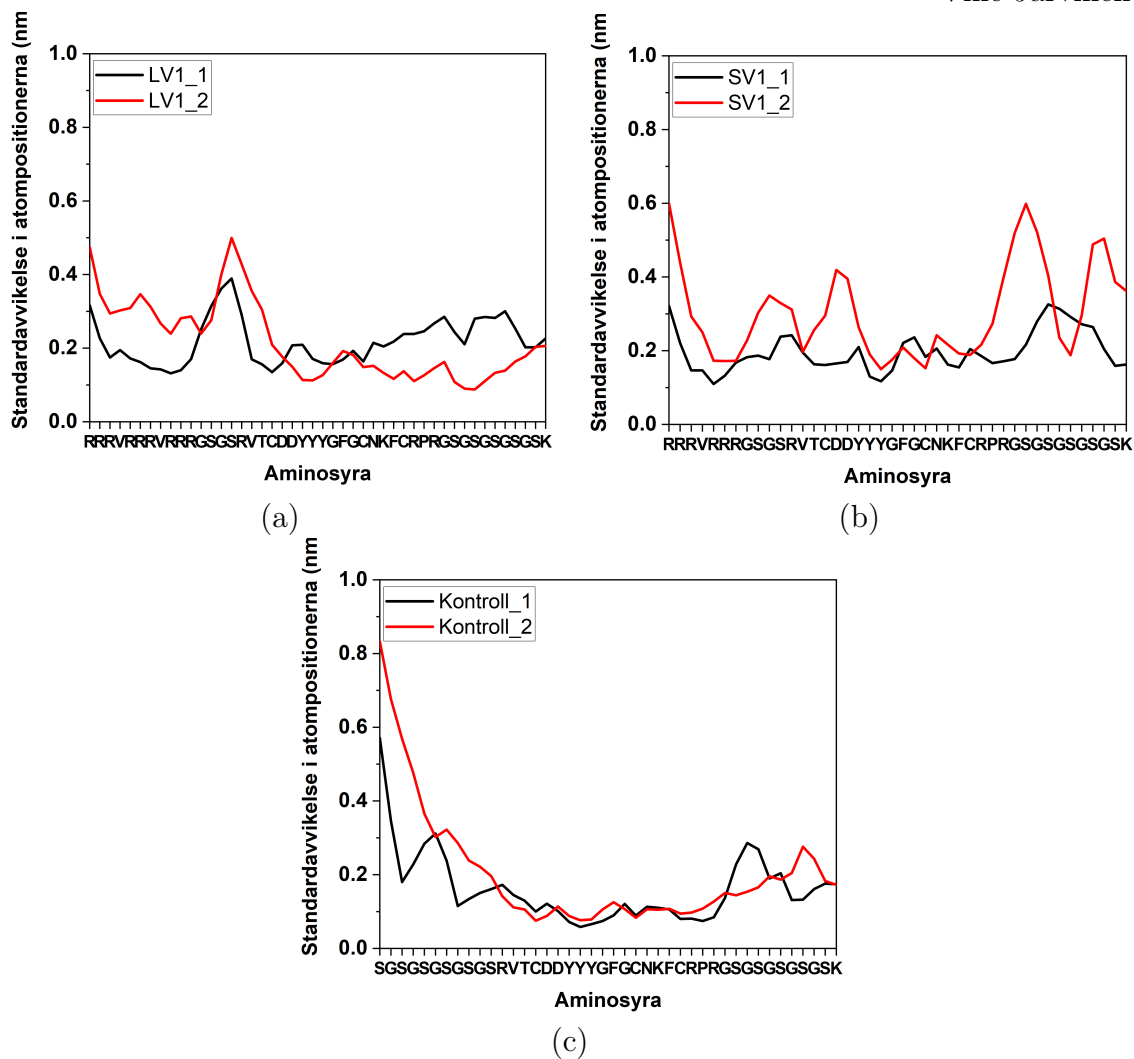
Simuleringarna utan elektriska fält lämpar sig till att beräkna RMSF-värden för peptiderna. Peptidernas RMSF-värden föreslår vilka aminosyror som fluktuerar mest från en medelstruktur och vilka minst. Figur 4.3 visar att peptidens laddade ända har den största standardavvikelsen och att bindningssekvensen har de lägsta fluktuationerna.



Figur 4.1: RMSD-värden för peptidens ryggrad under 75 ns utan elektriska fält för (a) LV1-peptiderna, (b) SV1-peptiderna och (c) Kontroll-peptiderna.



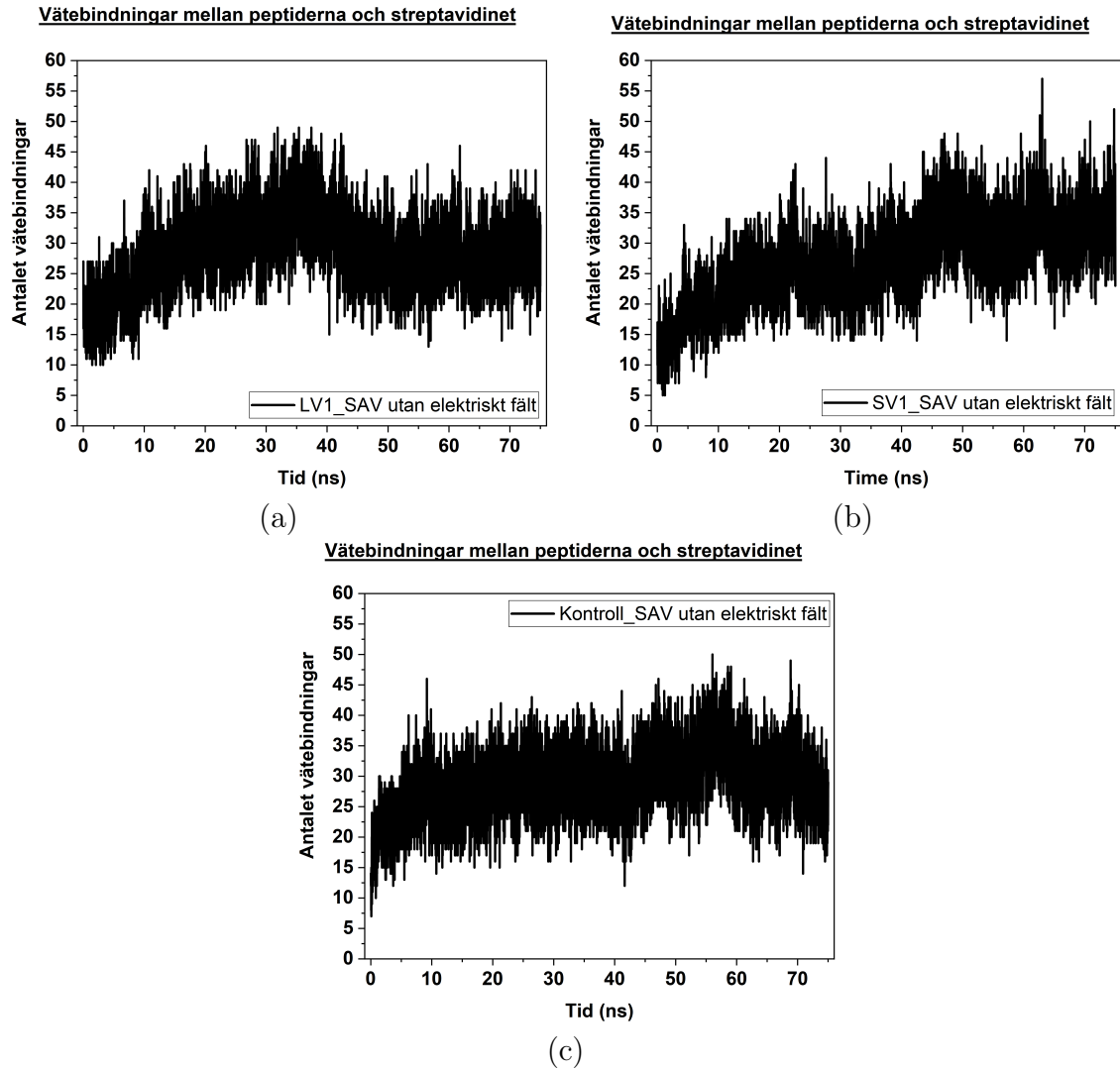
Figur 4.2: RMSD-värden för peptidens bindningssekvens ryggrad under 75 ns utan elektriska fält för (a) LV1-peptiderna, (b) SV1-peptiderna och (c) Kontroll-peptiderna.



Figur 4.3: RMSF-värden för peptidens ryggrad beräknat för 50 ns för (a) LV1-peptiderna, (b) SV1-peptiderna och (c) Kontroll-peptiderna.

Analys av antalet vätebindningar internt i bindningssekvensen för peptiderna visar också en stabil struktur under 75 ns och illustreras i figurerna A.1, A.2 och A.3 i bilagan. Antalet vätebindningar inom bindningssekvensen i dessa grafer kan relateras till antalet vätebindningar som motsvarande struktur i Jagged1-kristallstrukturen visar med samma analysmetod. Antalet vätebindningar i den strukturen var fem stycken. I samtliga grafer i bilagan fluktuerar antalet kring fem, med ett undantag i SV1_1-peptiden i figurerna A.2 och A.5. Orsaken till den sistnämnda avvikelser är oklar och analysen dubbelkollades utan att hitta fel och den ända logiska förklaringen är att AV1_1-peptiden fått en drastiskt ändrad konformation vid energiminimeringen.

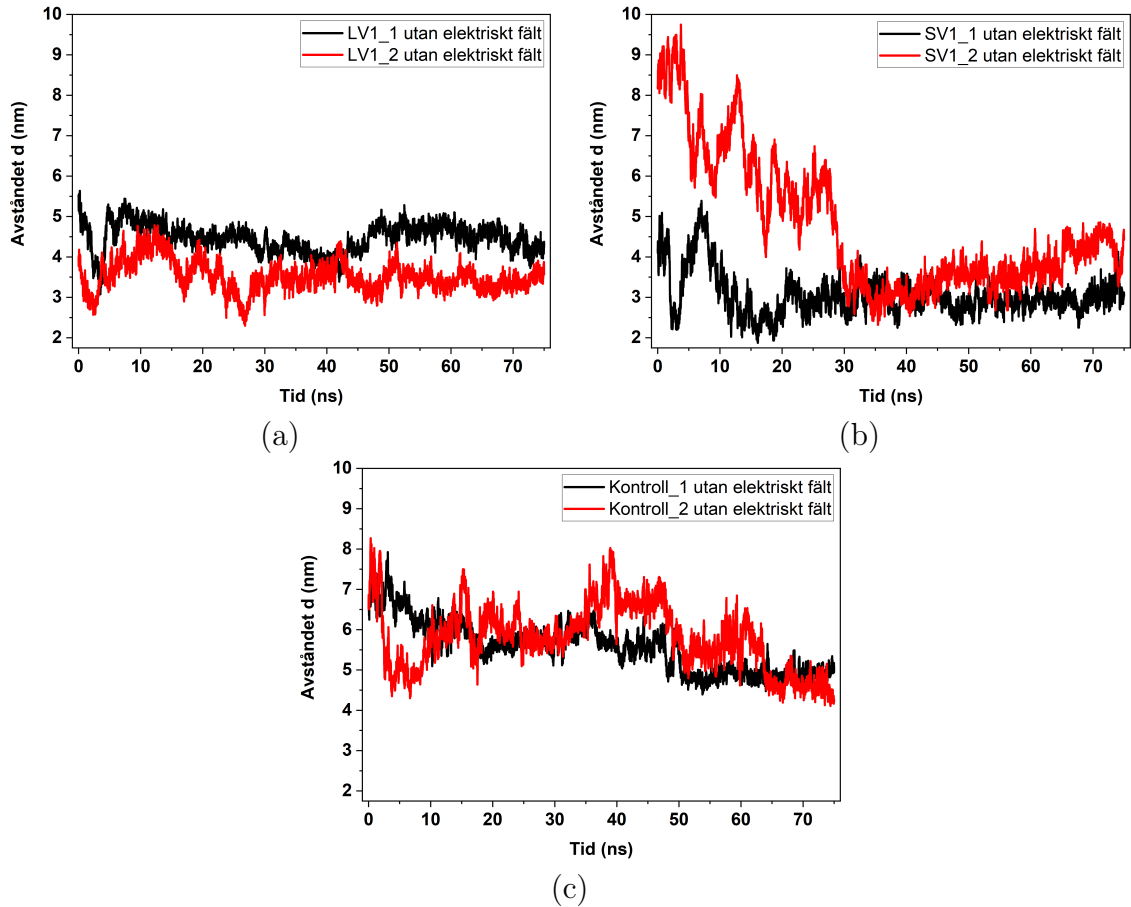
Undersöker man däremot vätebindningarna mellan peptiderna och streptavidinet (figur 4.4) så ökar de under de första 25 ns rätt så kraftigt men även under de följande 50 ns för samtliga simuleringssystem. Det innebär att peptiderna verkar komma i kontakt med streptavidinet mer och mer.



Figur 4.4: Antalet vätebindningar mellan peptiderna och streptavidinet under 75 ns för (a) LV1-systemet, (b) SV1-systemet och (c) Kontroll-systemet.

Avståndsanalysen i figur 4.5 visar att peptidernas N-terminaler antingen hålls omkring samma höjd eller sjunker, d.v.s. kommer närmare streptavidinet som stöder det tidigare påståendet som baserade sig på vätebindningar. Alla peptiders N-terminaler visar sig stabilisera vid omkring 4 nm från streptavidinets botten. Det innebär att peptidernas laddade grupper befinner sig ca 5 nm från elektrodytan vid jämvikt och det elektriska fältet i figur 3.1 kan relateras till simuleringarna.

Fältstyrkan är således ungefär två storleksordningar större än enligt modellen för det laddade dubbelskiktet för cellodlingsmedium som lösning. Vid avståndet 10 nm har fältstyrkan sjunkit med ytterligare tre storleksordningar. Med andra ord finns det en stor risk att peptiderna inte kan styras i cellodlingsmedium med denna ytfunktionalisering. Däremot är möjligheterna större med lösningar med svagare jonstyrka.



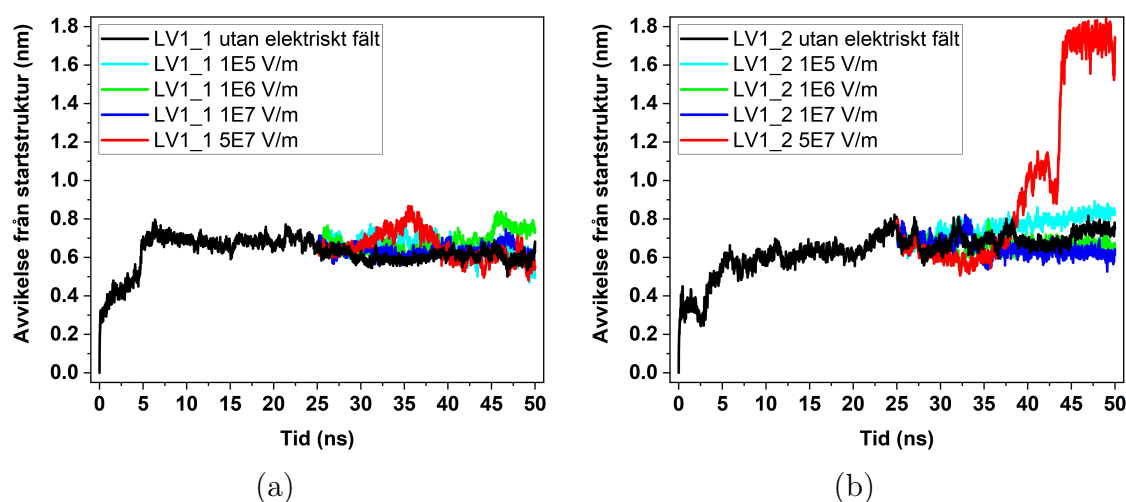
Figur 4.5: Avståndet d från undertill på streptavidinet till peptidens N-terminal under 75 ns utan elektriska fält för (a) LV1-peptiderna, (b) SV1-peptiderna och (c) Kontroll-peptiderna.

4.2 Peptider i elektriska fält med olika styrkor

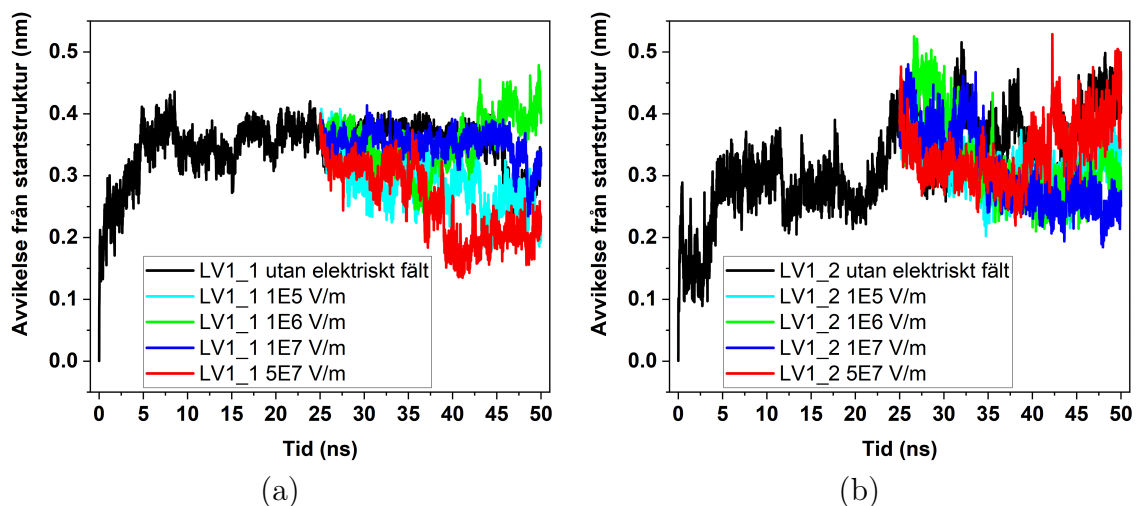
Det visar sig vara svårt att urskilja responser med svagare fältstyrkor än $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ enligt figurerna 4.6, 4.7 och 4.8. En lösning vore att förlänga simuleringstiden men det skulle betyda exempelvis femdubbel ökning från de redan flera dagar långa

simuleringarna. De enda responserna ses vid $\pm 5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ och eftersom strukturella förändringar vill observeras användes den styrkan för resten av simuleringarna. En bidragande orsak till varför peptiderna verkar långsamma att reagera på applicerade krafter är vätebindningarna som bildats mellan peptiderna och streptavidinet som gör det svårt att skilja på dem i en kort 25 ns simulering. Det betyder att processerna kan ske i svagare elektriska fält men metodens begränsningar tillåter inte undersökning om det faktiskt är så.

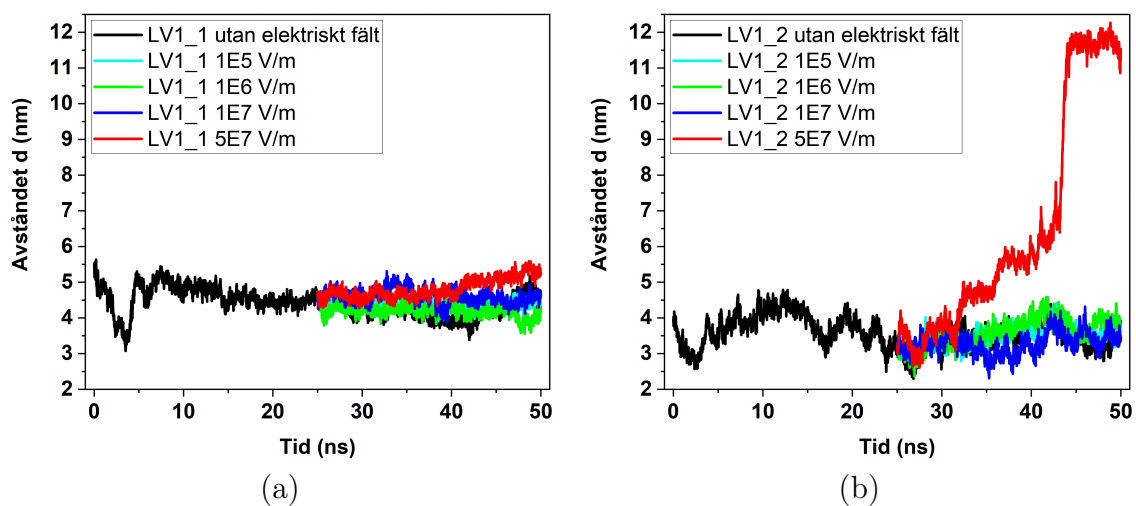
Fältstyrkan $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ lämpar sig för denna tidsskala på 25 ns och ifall tidsskalan skulle förlängas till, säg, 500 ns kanske $1 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ skulle räcka men eftersom simuleringstiden är begränsad kan processen för snabbas med en fältstyrka större än i verkligheten.



Figur 4.6: RMSD-värden för peptidens ryggrad under 50 ns utan elektriska fält och under 25 ns med fyra olika fältstyrkor med identiska startstrukturer vid 25 ns. LV1_1-peptiden i (a) och LV1_2-peptiden i (b).



Figur 4.7: RMSD-värden för peptidens bindningssekvens ryggrad under 50 ns utan elektriska fält och under 25 ns med fyra olika fältstyrkor med identiska startstrukturer vid 25 ns. LV1_1-peptiden i (a) och LV1_2-peptiden i (b).



Figur 4.8: Avståndet d från undertill på streptavidinet till peptidens N-terminal under 50 ns för fyra olika fältstyrkor och utan, för (a) LV1_1-peptiden och (b) LV1_2-peptiden

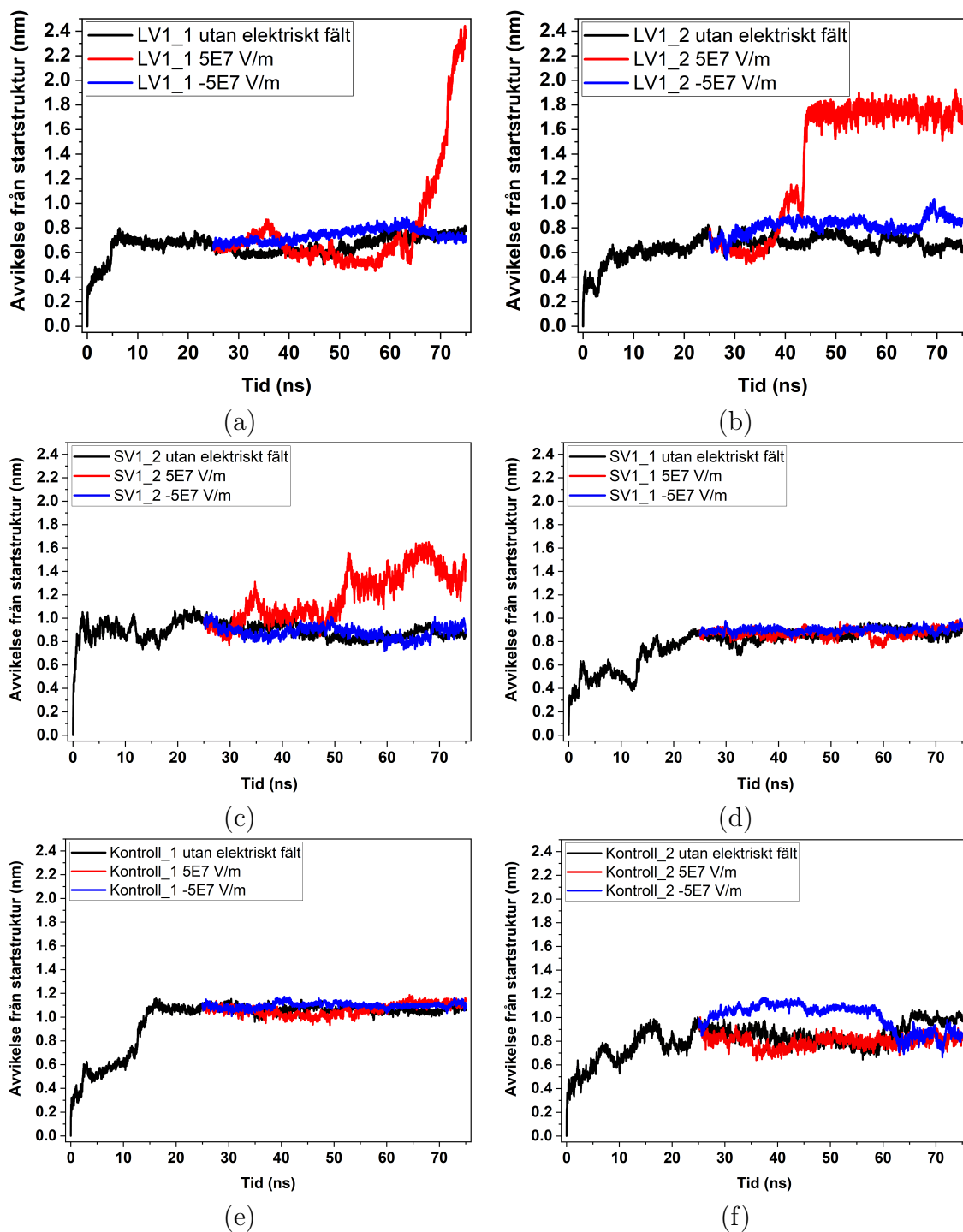
4.3 Peptider i elektriska fält med olika riktning

RMSD-analysen för LV1-, SV1- och Kontroll-peptidernas ryggrad (figur 4.9) visar i vissa fall förändringar men antingen först mot slutet av simuleringstiden eller bara på en av de två peptiderna. Detta tyder på att tidsskalan inte riktigt räcker

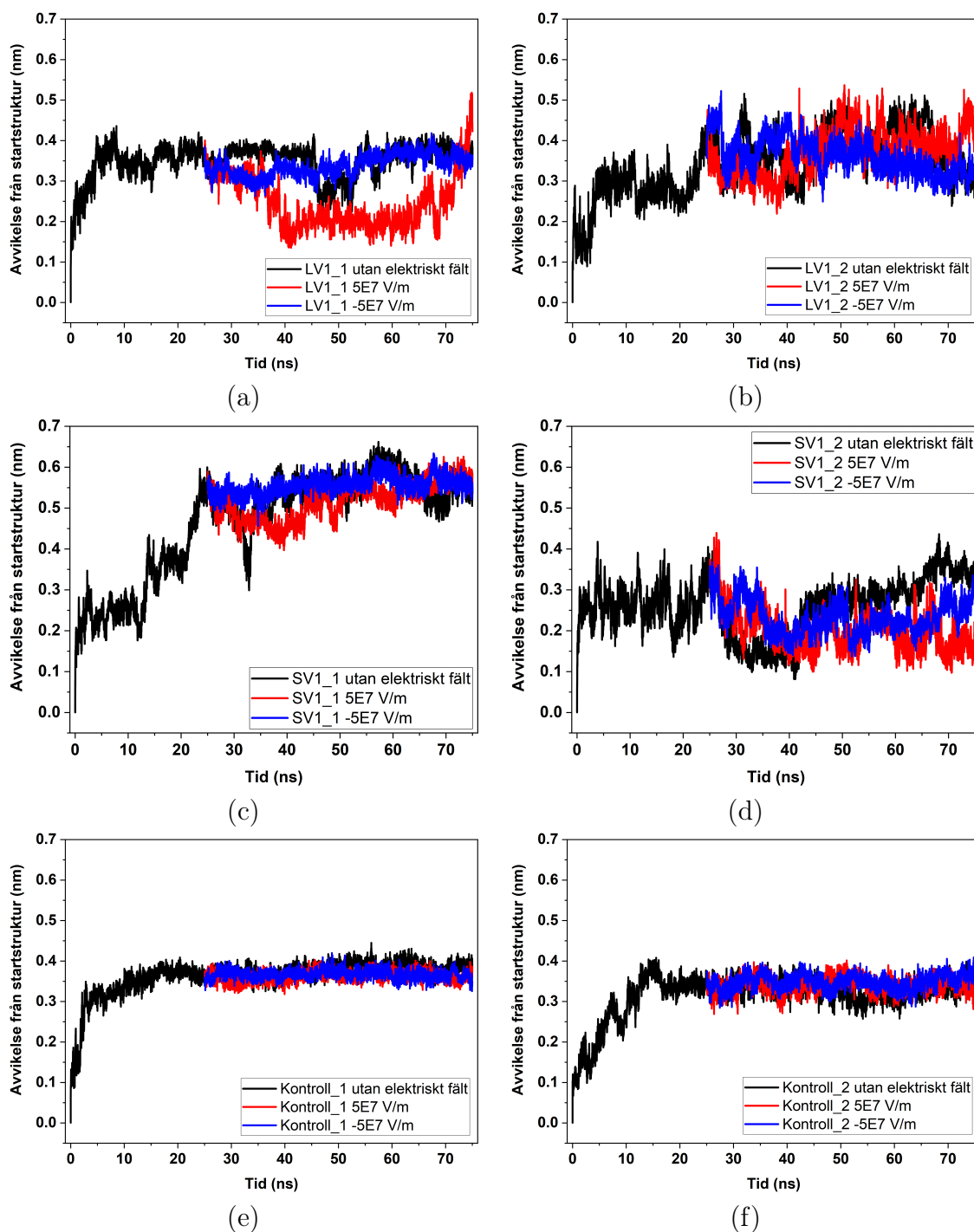
till. Kontroll-peptiderna utan laddning visar som förväntat mycket små skillnader i avvikelser från startstruktur med olikriktade fältstyrkor.

RMSD-analysen för ryggraden för peptidernas bindningssekvens (figur 4.10) visar ingen tydlig diskriminering mellan de olikriktade fältstyrkorna, vilket är ett bra tecken eftersom det tyder på att peptidens viktiga sekvens förblir stabil och strukturellt intakt. Eftersom värdet i sig inte nödvändigtvis säger så mycket är det man har att gå efter endast jämförelser med fallet utan elektriska fält.

Antalet vätebindningar inom bindningssekvensen visar igen stabilitet i strukturen eftersom figurerna A.4, A.5 och A.6 i bilagan visar varken ökande eller minskande trender.

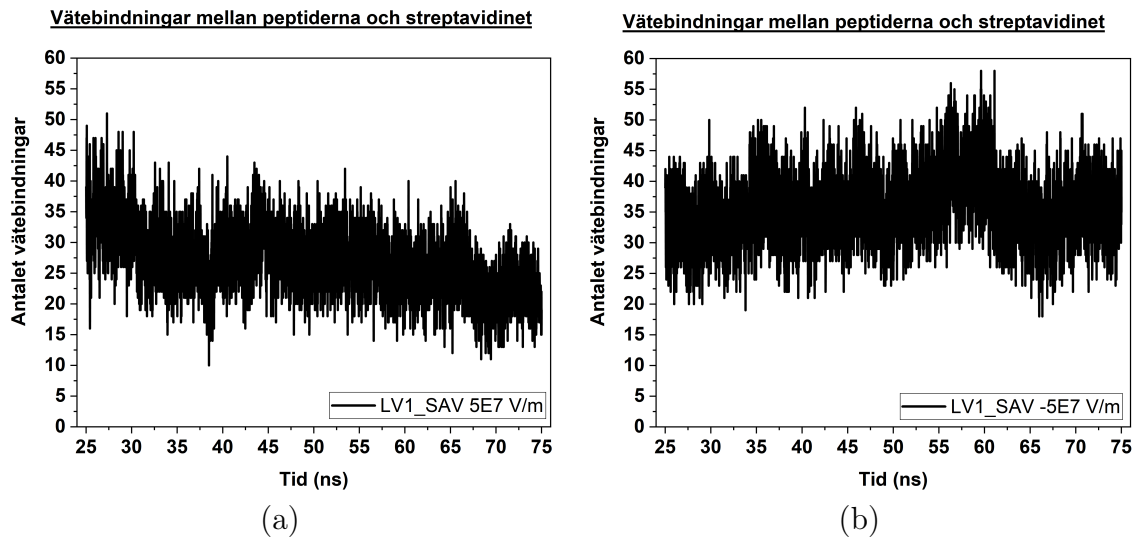


Figur 4.9: RMSD-värden för peptidens ryggrad under 25 ns utan elektriska fält (svart) efterföljt av tre olika 50 ns simuleringar både utan elektriska fält och med fältstyrka på $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ (röd) och $-5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ (blå) med identiska startstrukturer vid 25 ns. LV1-peptiderna i (a) och (b), SV1-peptiderna i (c) och (d) samt Kontroll-peptiderna i (e) och (f).

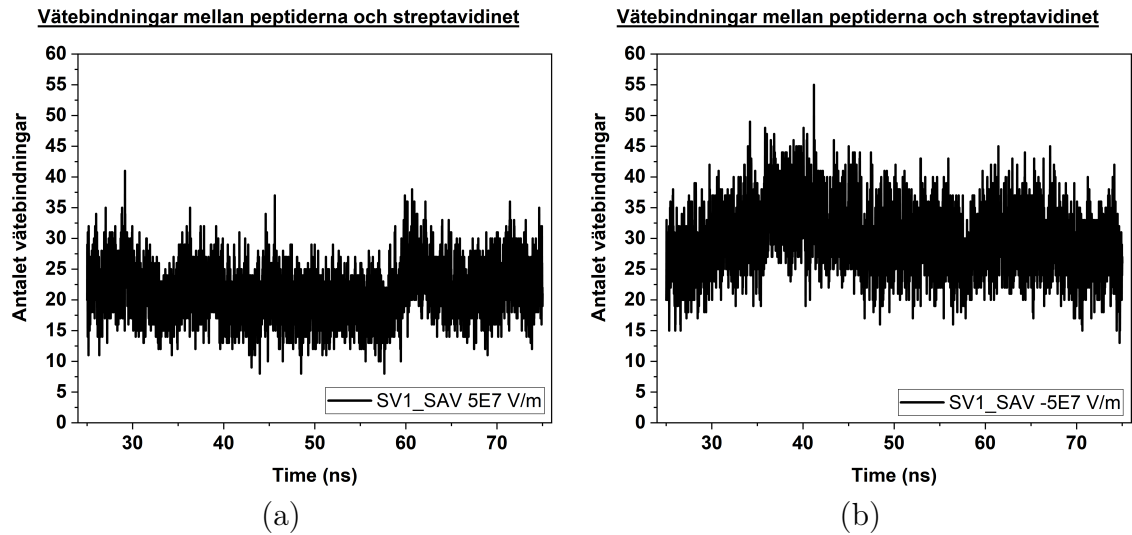


Figur 4.10: RMSD-värden för peptidens bindningssekvens ryggrad under 25 ns utan elektriska fält (svart) efterföljt av tre olika 50 ns simuleringar både utan elektriska fält och med fältstyrka på $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ (röd) och $-5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ (blå) med identiska startstrukturer vid 25 ns. LV1-peptiderna i (a) och (b), SV1-peptiderna i (c) och (d) samt Kontroll-peptiderna i (e) och (f).

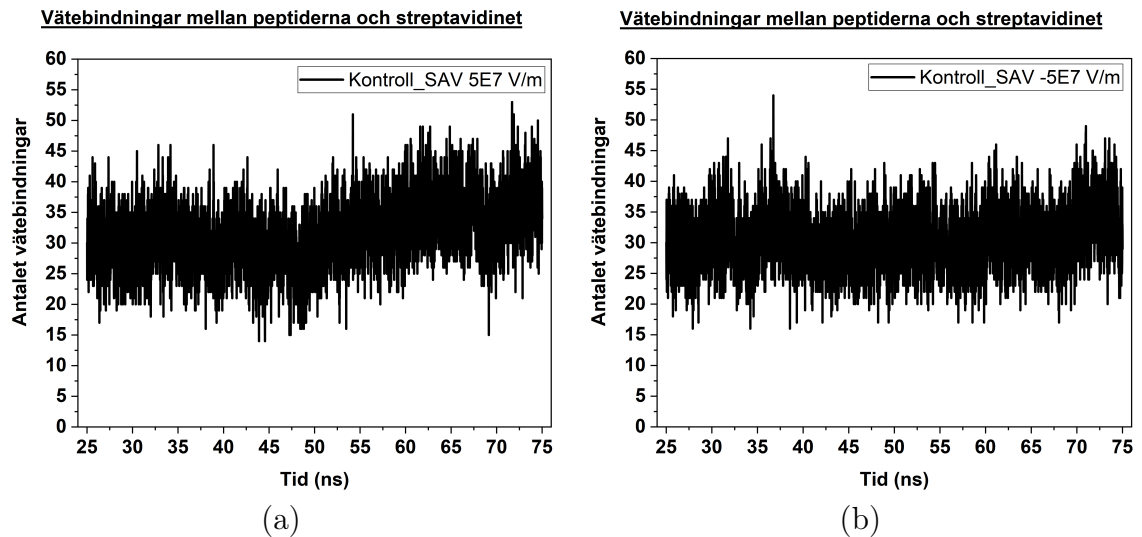
Figur 4.11 visar en minskning i vätebindningar mellan peptiderna och streptavidinet i elektriska fält applicerade i positiv y-riktning vilket indikerar att LV1-peptiderna vecklas ut från ytan av streptavidinet. Det samma kan inte sägas om SV1-systemet i figur 4.12 där ingen tydlig trend kan ses för varken positiva eller negativa elektriska fält. Men SV1-peptiden utsätts också för svagare krafter p.g.a. dess mindre laddning och samma tidsskala kanske inte räcker till. Kontroll-peptiderna kan enligt figur 4.13 konstateras antingen bilda en alltmera starkare interaktion med streptavidinet oberoende elektriska fält eller så behåller dem interaktionen som skapats under de första 25 ns (figur 4.4) utan elektriska fält som utgör startstrukturen för simuleringarna med elektriska fält.



Figur 4.11: Antalet vätebindningar mellan LV1-peptiderna och streptavidinet under 50 ns med elektriska fält med styrkan $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ i (a) och $-5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ i (b).



Figur 4.12: Antalet vätebindningar mellan SV1-peptiderna och streptavidinet under 50 ns med elektriska fält med styrkan $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ i (a) och $-5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ i (b).



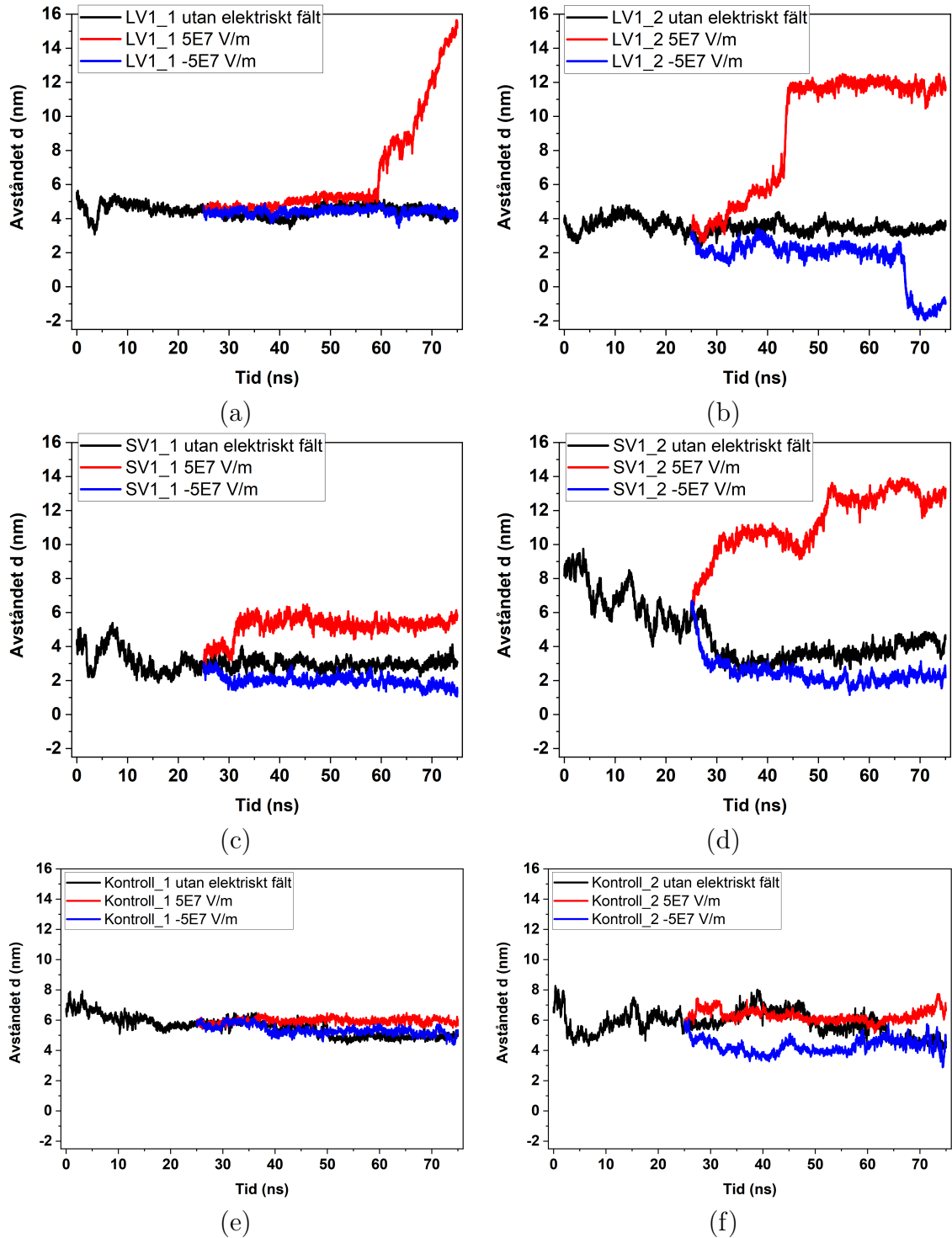
Figur 4.13: Antalet vätebindningar mellan Kontroll-peptiderna och streptavidinet under 50 ns med elektriska fält med styrkan $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ i (a) och $-5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ i (b).

Avståndsanalysen i figur 4.14 visar den tydligaste responsen på olikriktade elektriska fält men responsen som syns som ökande avstånd är större än responsen som syns som minskande avstånd. Detta beror troligtvis på att streptavidinet är i vägen för peptidernas ändor att böja sig neråt ytterligare men ändorna är friare att röra sig uppåt. LV1-peptiderna visar tydligt ökande avstånd med det positiva elektriska fältet men mindre tydligt minskande avstånd med det negativa elektriska fältet. SV1-peptiderna visar responser för både positiva och negativa elektriska fält

Ville Järvinen

men i jämförelse med Kontroll-peptidernas responser är skillnaderna ändå små, åtminstone för SV1_1-peptiden. Kontroll-peptiderna stabiliserar sig vid en viss höjd och fluktuerar inte mycket men utgör ett mått på vad som klassas som respons.

Det är klart att variationerna mellan responserna mellan de två identiska peptiderna är stora. Längre simuleringar kunde definitivt minimera dessa variationer, också introducering av olika startkonfigurationer och flera simuleringar kunde göra resultaten tydligare.



Figur 4.14: Avståndet d från undertill på streptavidinet till peptidens N-terminal under 25 ns utan elektriska fält (svart) efterföljt av tre olika 50 ns simuleringar både utan fältstyrka och med fältstyrkan $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ (röd) och $-5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ (blå) med identiska startstrukturer vid 25 ns. LV1-peptiderna i (a) och (b), SV1-peptiderna i (c) och (d) samt Kontroll-peptiderna i (e) och (f).

Kapitel 5

Slutsatser och sammanfattning

I början av avhandlingsarbetet var planen att simulera ett system bestående av flera grupper av streptavidin med peptider som är fästa ovanpå det självorganiserande monolagret som är bundet till en guldyta. Detta visade sig vara för tidskrävande och avancerat inom omfattningen av denna avhandling. Därför gjordes valet att fokusera på peptidernas samspel med streptavidin-proteinet. Eftersom tidigare studier [2] av det självorganiserande monolagret visat att det är väligt ordnat och tunt förväntas inga dramatiska fenomen som skulle påverka peptiderna direkt. Därför kan metoden med positionsbegränsningarna undertill på streptavidinet antas representera en del av den verkliga ytan med tillräcklig precision.

Strukturanalyserna omfattade RMSD-analys för peptiderna, bindningssekvensen för peptiderna, antalet vätebindningar inom peptidernas bindningssekvens, antalet vätebindningar mellan peptiderna och streptavidinet men också peptidändens avstånd från undertill på streptavidinet. Analyserna åskådliggjorde det elektriska fältets inverkan på strukturen hos peptidernas bindningssekvens och kan konstateras ha minimal effekt på bindningssekvensens struktur. Avståndsanalysen i figur 4.14 visar däremot en tydlig differentiering i responsen som funktion av fältets riktning. Hypotesen var att peptider med positiv laddning i ändan kan sträckas ut eller böjas med elektriska fält riktade uppåt respektive nedåt och på basis av denna studie ser det ut som att hypotesen kan bekräftas för lösningar med lägre jonstyrka än cellodlingsmedium.

Orsaken till att bindningssekvensens stabilitet och struktur är viktig och intressant är att peptiden ska kunna binda till Notch-receptorn även om en elektrisk potential är applicerad. Som resultaten visar verkar bindningssekvensens strukturella integritet

behållas vid varierande elektriska fält. Men eftersom studien inte undersökte interaktioner till receptorn kan det inte heller ges resultat om peptidernas affinitet till Notch-receptorn.

Som resultaten i kapitel 4.1 visar interagerar peptiderna naturligt med ytan av streptavidinet och vätebindningar formas mellan peptiderna och tillgängliga aminosyror på ytan av streptavidinet. Detta innebär att peptiderna påverkas mindre än förväntat av elektriska fält, eftersom de anpassar sig till hela komplexet och hittar en stabilare struktur.

Kapitel 4.2 visade att simuleringen med den elektriska fältstyrkan $10^8 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ resulterade i biotinetets lossnande från streptavidinet. Vidare resulterade fältstyrkan på $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ inte i samma destruktiva följd, vilket betyder att dissociering av biotin och streptavidin sannolikt inte händer vid fältstyrkor mindre än $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$. Samtidigt påvisar resultaten för fältstyrkor mindre än eller lika med $10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ att inga tydliga strukturella förändringar sker. Detta leder till ett smalt område kring $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ där den elektriska fältstyrkan har en inverkan på peptiderna utan att förstöra strukturen. Det är ändå viktigt att komma ihåg att simuleringarna studerar systemet under en väldigt kort tid och en förlängd simuleringstid skulle ge mer tillförlitliga resultat. Ifall flera olika startstrukturer för peptiderna dessutom kunde implementeras skulle det kunna ge mer pålitliga resultat.

Som beräkningarna för fältstyrkans profil i kapitel 3 demonstrerar, uppnås betydligt svagare fältstyrka i praktiken än vad som används i simuleringarna. Dessa beräkningar är viktiga för att validera resultaten från molekylodynamiken eftersom fältstyrkan är stor och tidsskalan liten i förhållande till experimentella uppställningar. Den viktiga poängen är att ju närmare elektrodytan peptidernas laddningar är desto starkare elektriska fält påverkas de av.

Det är tydligt att metoderna i avhandlingen är lämpliga för att undersöka strukturella förändringar för ideala system och jämföra skillnader i konformationsändringarna mellan olika peptider. Däremot fallerar metoderna i att reproducera andra fenomen som är av stor vikt i verkliga experiment, såsom det laddade dubbelskiktet för att skapa ett exponentiellt avtagande elektriskt fält med avseende på avstånd från elektrodytan. En annan logisk brist hos metoden är att processer som sker under längre tid än hundratals nanosekunder förblir osedda på en tidsskala på 100 ns. Ett exempel på en sådan process kan vara att uppnå jämviktsläge för peptidkonformationer i svagare fältstyrkor.

Ville Järvinen

Diskussionen i kapitlet 2.5 behandlade likheter och olikheter mellan kraftfält med polariserbara molekyler och icke-polariserbara molekyler, och slutsatsen var att fortsatta studier på motsvarande system gjorda med kraftfält som implementerat polariserbarhet skulle ge en god översikt över likheter och olikheter mellan kraftfälten. Det skulle också ge en indikation på bristerna med modellering av dylika system med icke-polariserbara molekyler jämfört med polariserbara.

Litteraturförteckning

- [1] Chandramouli R. Chillakuri m. fl. "Structural Analysis Uncovers Lipid-Binding Properties of Notch Ligands". I: *Cell Reports* 5.4 (2013), s. 861–867. ISSN: 2211-1247. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.029>.
- [2] Eleonora Macchia m. fl. "Single-molecule detection with a millimetre-sized transistor". I: *Nature Communications* 9 (2018).
- [3] Jun Li m. fl. "Rationally Designed Peptide Interface for Potential Modulated Cell Adhesion and Migration". I: *Advanced Materials Interfaces* 2.15 (2015), s. 1500335. DOI: 10.1002/admi.201500335.
- [4] Eleonora Cantini m. fl. "Electrically Responsive Surfaces: Experimental and Theoretical Investigations". I: *Accounts of Chemical Research* 49.6 (2016). PMID: 27268783, s. 1223–1231. DOI: 10.1021/acs.accounts.6b00132.
- [5] Yi Chen m. fl. "Electrically Induced Conformational Change of Peptides on Metallic Nanosurfaces". I: *ACS Nano* 6.10 (2012). PMID: 22897498, s. 8847–8856. DOI: 10.1021/nn3027408.
- [6] Guoyo Wu. *Amino Acids : Biochemistry and Nutrition*. ProQuest Ebook Central <https://ebookcentral.proquest.com/lib/abo-ebooks/detail.action?docID=1165871>. Baton Rouge: Taylor och Francis Group, 2013.
- [7] Schrödinger, LLC. "The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8". Nov. 2015.
- [8] Jung Wook Lee m. fl. "Characterization of a self-assembled monolayer of thiol on a gold surface and the fabrication of a biosensor chip based on surface plasmon resonance for detecting anti-GAD antibody". I: *Biosensors and Bioelectronics* 20.7 (2005), s. 1422–1427. ISSN: 0956-5663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.04.017>.
- [9] Reitz m. fl. *Foundations of electromagnetic theory*. 4. utg. Addison-Wesley, 1992.

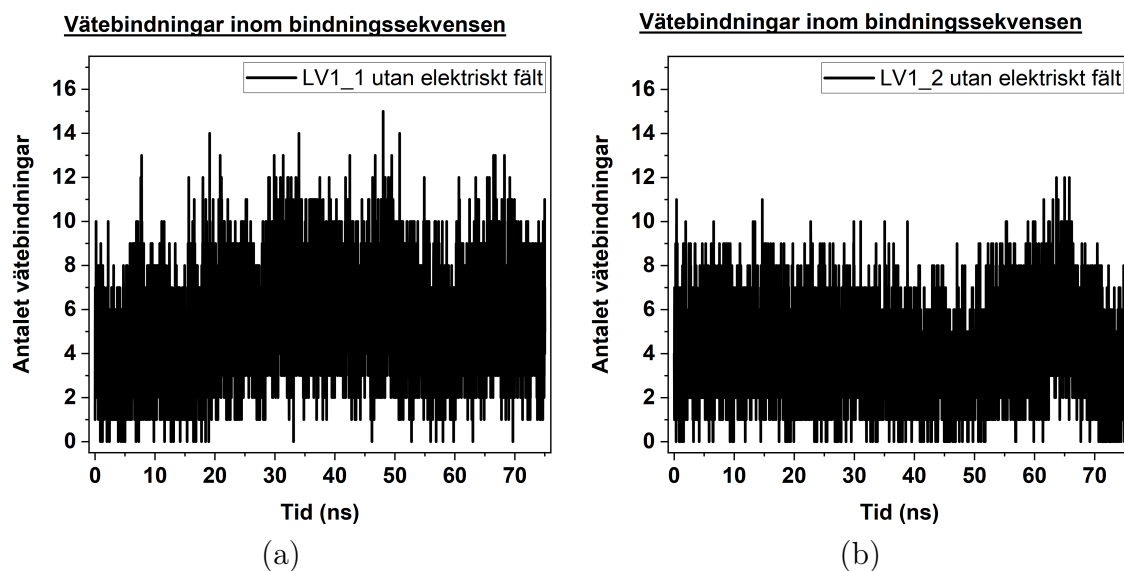
- [10] Ohshima och Hiroyouki. *Electrical Phenomena at Interfaces and Biointerfaces : Fundamentals and Applications in Nano-, Bio-, and Environmental Sciences*. 4. utg. ProQuest Ebook Central <https://ebookcentral.proquest.com/lib/abo-ebooks/detail.action?docID=818455>. John Wiley och Sons, Incorporated, 2012.
- [11] Mark James Abraham m.fl. "GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers". I: *SoftwareX* 1-2 (2015), s. 19–25. ISSN: 2352-7110. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
- [12] Wei Huang, Zhixiong Lin och Wilfred F. van Gunsteren. "Validation of the GROMOS 54A7 Force Field with Respect to -Peptide Folding". I: *Journal of Chemical Theory and Computation* 7.5 (2011). PMID: 26610119, s. 1237–1243. DOI: [10.1021/ct100747y](https://doi.org/10.1021/ct100747y).
- [13] Szilárd Páll m.fl. "Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS". I: *Solving Software Challenges for Exascale*. Utg. av Stefano Markidis och Erwin Laure. Cham: Springer International Publishing, 2015, s. 3–27.
- [14] Sander Pronk m.fl. "GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit". I: *Bioinformatics* 29.7 (febr. 2013), s. 845–854. ISSN: 1367-4803. DOI: [10.1093/bioinformatics/btt055](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt055).
- [15] Berk Hess m.fl. "GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation". I: *Journal of Chemical Theory and Computation* 4.3 (2008). PMID: 26620784, s. 435–447. DOI: [10.1021/ct700301q](https://doi.org/10.1021/ct700301q).
- [16] David Van Der Spoel m.fl. "GROMACS: Fast, flexible, and free". I: *Journal of Computational Chemistry* 26.16 (2005), s. 1701–1718. DOI: [10.1002/jcc.20291](https://doi.org/10.1002/jcc.20291).
- [17] H.J.C. Berendsen, D. [van der Spoel] och R. [van Drunen]. "GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation". I: *Computer Physics Communications* 91.1 (1995), s. 43–56. ISSN: 0010-4655. DOI: [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00042-E](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00042-E).
- [18] Lindahl m.fl. *GROMACS 2019.6 Source code*. Version 2019.6. Febr. 2020. DOI: [10.5281/zenodo.3685922](https://doi.org/10.5281/zenodo.3685922).
- [19] Lindahl m.fl. *GROMACS 2019.6 Manual*. Version 2019.6. Febr. 2020. DOI: [10.5281/zenodo.3685925](https://doi.org/10.5281/zenodo.3685925).

- [20] Kittel C. och McEuen P. *Introduction to solid State Physics*. 8. utg. Hoboken, N.J: Wiley, 2005.
- [21] Berk Hess m. fl. "LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations". I: *Journal of Computational Chemistry* 18.12 (1997), s. 1463–1472. DOI: 10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H.
- [22] Ulrich Essmann m. fl. "A smooth particle mesh Ewald method". I: *The Journal of Chemical Physics* 103.19 (1995), s. 8577–8593. DOI: 10.1063/1.470117.
- [23] Shuichi Miyamoto och Peter A. Kollman. "Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models". I: *Journal of Computational Chemistry* 13.8 (1992), s. 952–962. DOI: 10.1002/jcc.540130805.
- [24] Giovanni Bussi, Davide Donadio och Michele Parrinello. "Canonical sampling through velocity rescaling". I: *The Journal of Chemical Physics* 126.1 (2007), s. 014101. DOI: 10.1063/1.2408420.
- [25] Lindahl E., Hess B. och van der Spoel D. "GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis." I: *J Mol Model* 7 (2001), s. 306–317.
- [26] William Humphrey, Andrew Dalke och Klaus Schulten. "VMD – Visual Molecular Dynamics". I: *Journal of Molecular Graphics* 14 (1996), s. 33–38.
- [27] Andrej ali. "Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints". I: *Molecular Medicine Today* 1.6 (1995), s. 270–277. ISSN: 1357-4310. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(95\)91170-7](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(95)91170-7).
- [28] Alpeshkumar K. Malde m. fl. "An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0". I: *Journal of Chemical Theory and Computation* 7.12 (2011). PMID: 26598349, s. 4026–4037. DOI: 10.1021/ct200196m.
- [29] Justin A. Lemkul. *Protein-Ligand Complex*. URL: <http://www.mdtutorials.com/gmx/complex/index.html>.
- [30] Torsten John m. fl. "Growth, Polymorphism, and Spatially Controlled Surface Immobilization of Biotinylated Variants of IAPP21–27 Fibrils". I: *Biomacromolecules* 21.2 (2020). PMID: 31887030, s. 783–792. DOI: 10.1021/acs.biomac.9b01466.
- [31] Stefanie Freitag m. fl. "Structural studies of binding site tryptophan mutants in the high-affinity streptavidin-biotin complex". Edited by I. A. Wilson. I: *Journal of Molecular Biology* 279.1 (1998), s. 211–221. ISSN: 0022-2836. DOI: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1735>.

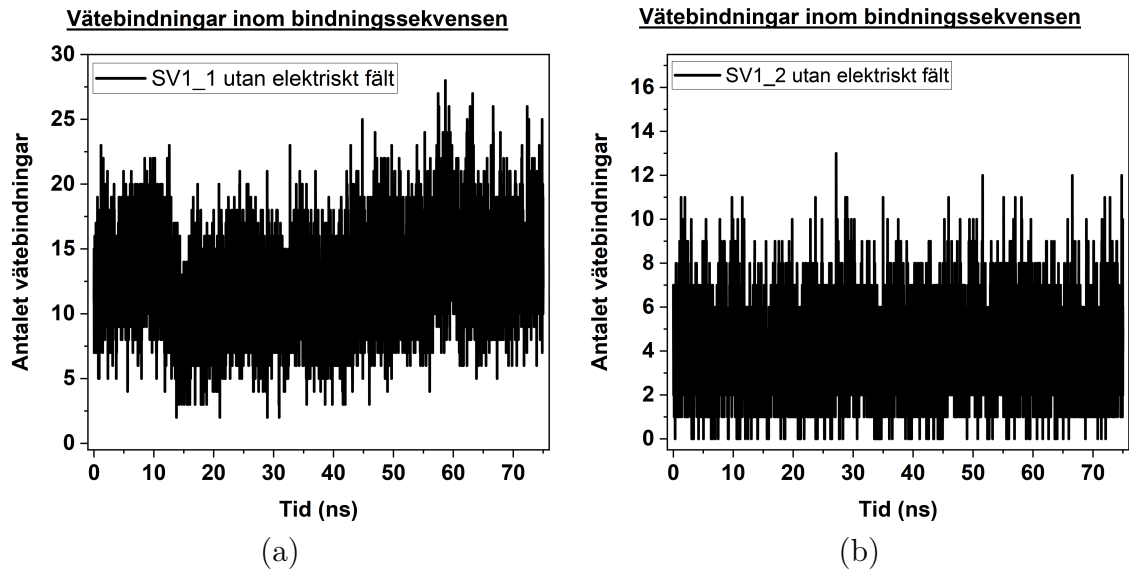
- [32] Magnus S. Bauer m.fl. "Monomeric streptavidin: a versatile regenerative handle for force spectroscopy". I: *bioRxiv* (2018). DOI: 10.1101/276444.
- [33] Felix Rico m.fl. "Heterogeneous and rate-dependent streptavidin–biotin unbinding revealed by high-speed force spectroscopy and atomistic simulations". I: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.14 (2019), s. 6594–6601. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1816909116.
- [34] *Other software - Gromacs*. URL: http://www.gromacs.org/Downloads/User_contributions/Other_software.

Bilaga A

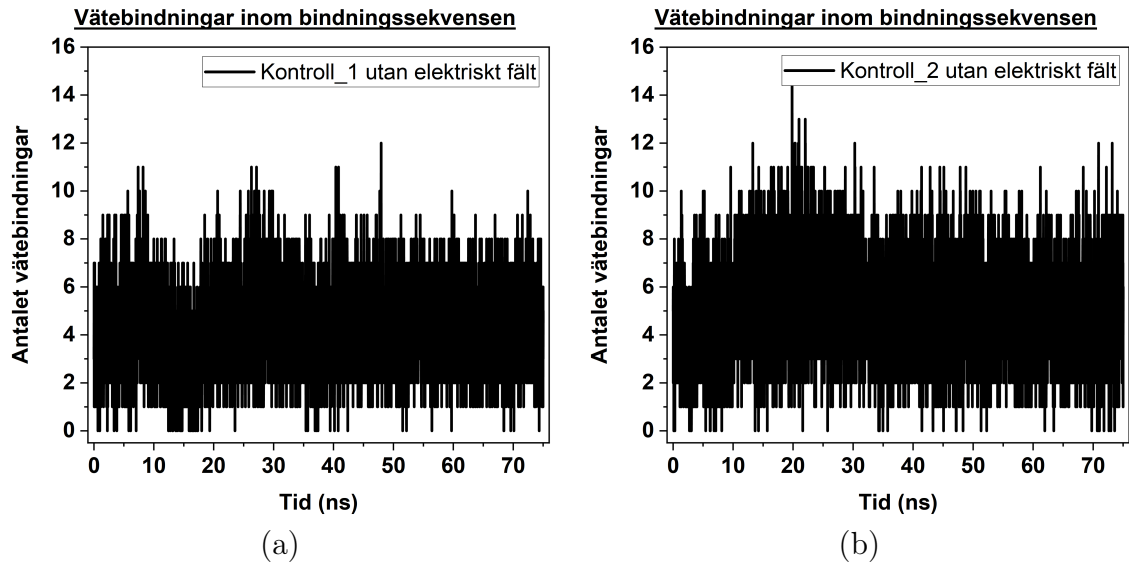
Figurer



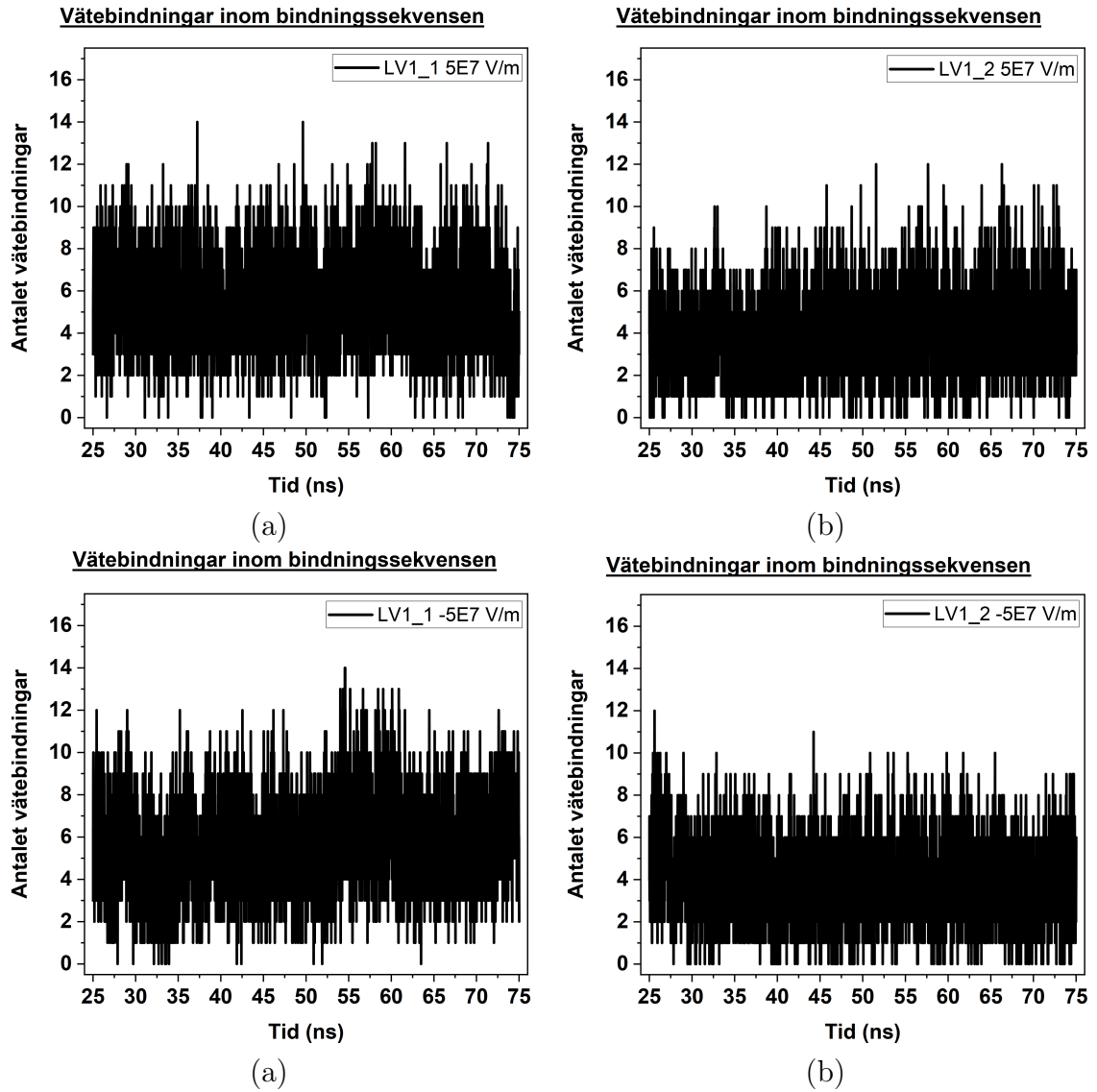
Figur A.1: Antalet vätebindningar inom bindningssekvensen för peptiderna under 50 ns utan elektriska fält för LV1_1-peptiden i (a) och LV1_2-peptiden i (b).



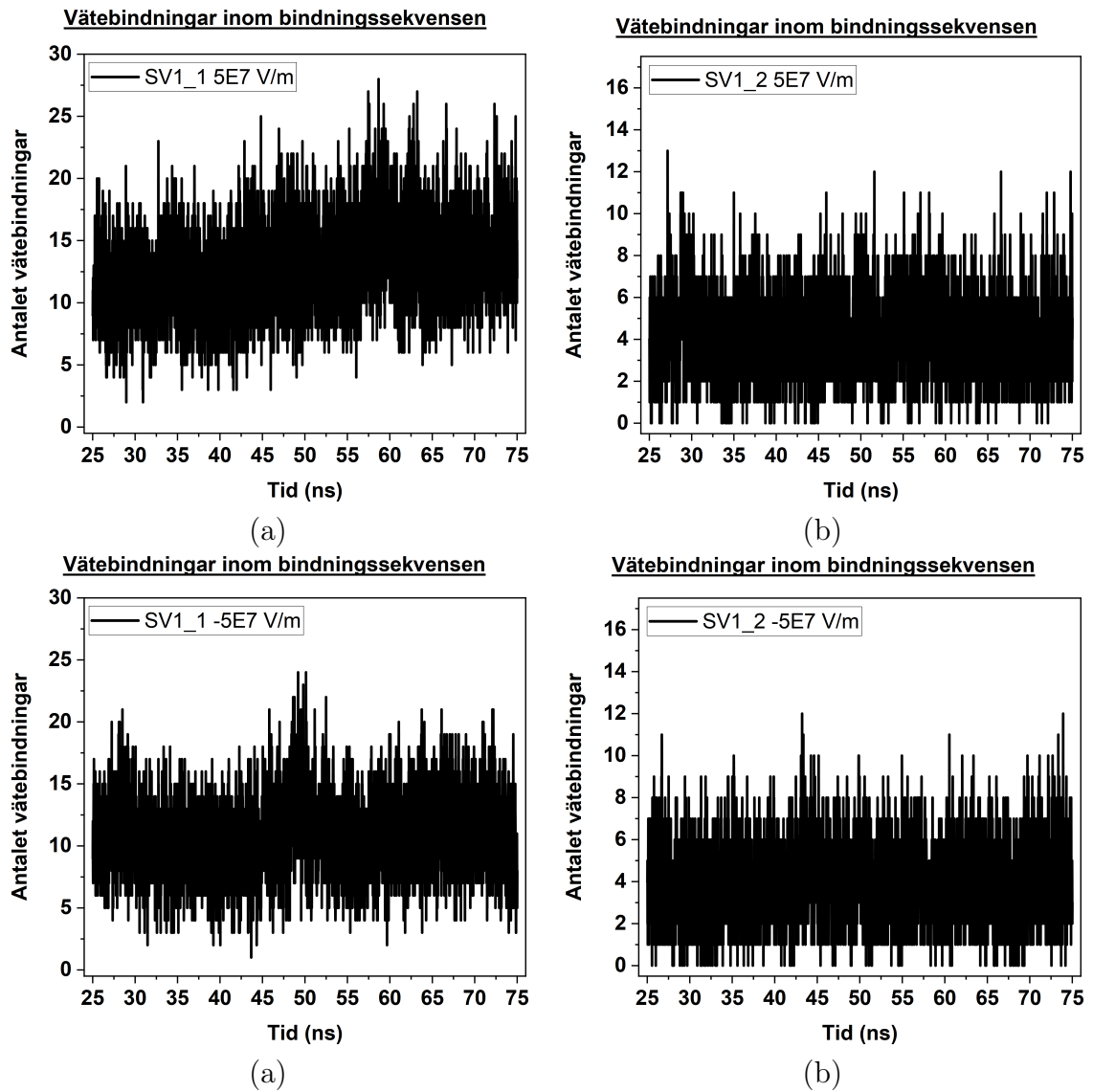
Figur A.2: Antalet vätebindningar inom bindningssekvensen för peptiderna under 50 ns utan elektriska fält för SV1_1-peptiden i (a) och SV1_2-peptiden i (b).



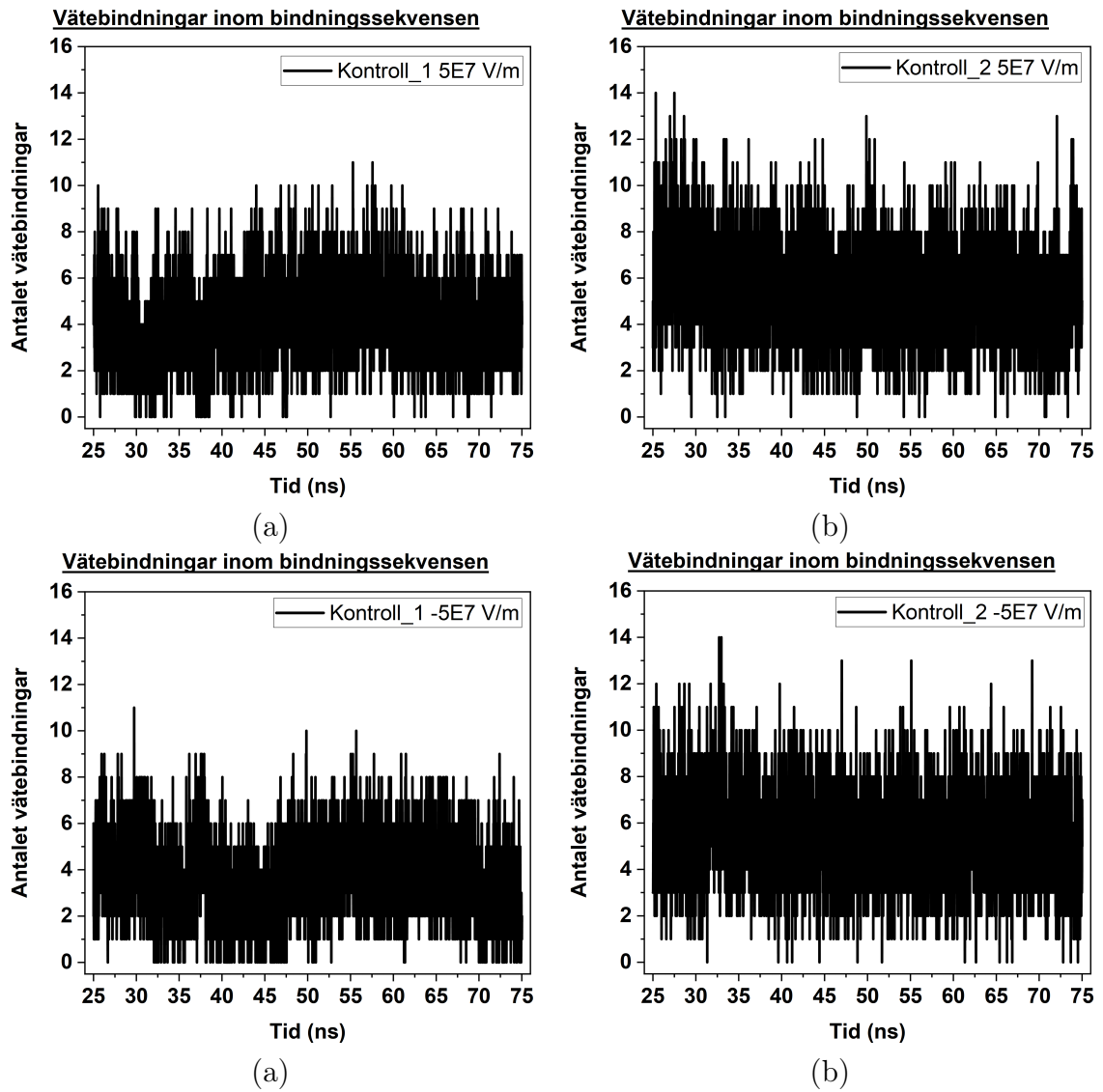
Figur A.3: Antalet vätebindningar inom bindningssekvensen för peptiderna under 50 ns utan elektriska fält för Kontroll_1-peptiden i (a) och Kontroll_2-peptiden i (b).



Figur A.4: Antalet vätebindningar inom bindningssekvensen för LV1-peptiderna under 50 ns med elektriska fält med styrkan $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ i (a) och (b) samt $-5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ i (c) och (d).



Figur A.5: Antalet vätebindningar inom bindningssekvensen för SV1-peptiderna under 50 ns med elektriska fält med styrkan $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ i (a) och (b) samt $-5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ i (c) och (d).



Figur A.6: Antalet vätebindningar inom bindningssekvensen för Kontroll-peptiderna under 50 ns med elektriska fält med styrkan $5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ i (a) och (b) samt $-5 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ i (c) och (d).