

Titán felületek és biomolekulák kölcsönhatásainak modellezése molekuladinamikai módszerekkel

Doktori (Ph. D.) értekezés

Szerző:

Tarjányi Tamás

Témavezető:

Dr. Tóth Zsolt

egyetemi docens

Fizika Doktori Iskola

Fizika Intézet

SZTE-TTIK

Szeged

2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	2
1 Bevezetés	4
2 Elméleti áttekintés, irodalmi előzmények	6
2.1 Titán implantátumok oszeointegrációja	6
2.2 A titán-dioxid módosulatok	10
2.2 Peptid molekulák	15
2.3 A MD számítások elméleti háttere	16
2.3.1 Bakugrás algoritmus	18
2.3.2 Verlet algoritmus	18
2.3.3 MD erőterek és topológia	19
2.3.4 Sebesség definiálása, hőmérséklet és nyomáscsatolás	22
2.4 Biomolekulák adhéziónak számítógépes modellezése	24
3 Célkitűzések	27
4 Módszerek	28
4.1 Az általam használt MD szimulációs rendszerek	28
4.2 MD szimulációs protokollok	31
4.3 MD trajektória eredmények elemzése	34
4.4 REMD szimuláció protokoll	35
4.5 Elhúzás szimuláció protokollok	37
4.6 Umbrella sampling és PMF	38
5 Eredmények és diszkusszió	40
5.1 A KRSR molekula - anatóz TiO_2 felület kölcsönhatásának MD szimulációja	40
5.2 Az anatózhoz kötött KRSR molekula konformációnak feltérképezése REMD szimulációval	46
5.3 Anatózhoz kötött KRSR peptid elhúzás szimulációja, a kötési szabadentalpia meghatározása	50
5.4 Peptidek szisztematikus összehasonlítása a TiO_2 felületeken MD szimulációk segítségével	55
5.5 Peptidek adszorpciója TiO_2 felületeken, a kötési energiák meghatározása	66
6 Magyar nyelvű összefoglalás és tézisek	73
7 Angol nyelvű összefoglalás és tézisek	78
8 Saját publikációk	83
9 Köszönetnyilvánítás	84
10 Irodalomjegyzék	85

Rövidítések jegyzéke

AFM – Atomierő-mikroszkóp (Atomic Force Microscope)

AMCSD - Amerikai ásványtani kristály struktúra adatbázis (American Mineralogist Crystal Structure Database)

Arg – Arginin (R)

Asp – Aszparagin (D)

BCC – Body Centered Cubic (tércentrált köbös)

BMP – Csont morfogenetikus fehérje (Bone Morphogenetic Protein)

BSP – Csont szialo fehérje (Bone SialoProtein)

CHARMM – Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics

CP Grade 4 titán – kereskedelmileg tiszta (Commercially Pure) titán anyag (AMS 4901 szabvány)

DFT – Sűrűségfunkcionál elmélet (Density Functional Theory)

EM – Energia-minimalizáció

FCC – Face Centered Cubic (lapcentrált köbös)

FF - Force Field (erőtér)

Gly – Glicin (G)

Grade 5 titán – 6% alumíniumot és 4% vanádiumot tartalmazó titán ötvözet (AMS 4911 szabvány)

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

GROMOS - GRONingen MOlecular Simulation

HCP - Hexagonal Close-Packed (szoros illeszkedésű hexagonális)

HPC – HPC (High-Performance Computing, nagy teljesítményű számítógépekre használt rövidítés)

HSA – Humán szérumalbumin (Human Serum Albumin)

IR – Infravörös (Infrared)

JMOL – Java MOlecular, java kódban írt molekula megjelenítő szoftver

KIFÜ - Kormányzati Informatikai Fejlesztési Ügynökség

Leu – Leucin (L)

Lys – Lizin (K)

MD – Molekuladinamikai

NAMD – Nanoscale Molecular Dynamics, korábban Not Another Molecular Dynamics Program, molekuladinamikai szoftvercsomag

NPT – izotermál-izobár sokaság, azaz állandó az N részecskeszám, P nyomás és T hőmérséklet

NVT - kanonikus sokaság, azaz állandó N részecskeszám, V térfogat és T hőmérséklet (izotermál-izochor)

PBC – Periodikus határfeltétel (Periodic Boundary Condition)

PMF – Átlagos erő potenciálja (Potential of Mean Force)

RDF – Radiális eloszlás függvény (Radial Distribution Function)

REMD – Replika-kicserélési molekuladinamikai módszer (Replica-Exchange Molecular dynamics)

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

Ser – Szerin (S)

ssNMR – Szilárdtest nukleáris mágneses rezonancia (Solid-state nuclear magnetic resonance)

Ti – Titán

TIP3P - Transferable Intermolecular Potential 3-Point

TiO₂ – Titán-dioxid

Vesta - Visualization for Electronic and Structural Analysis (vizualizációs szoftver)

VMD – Visual Molecular Dynamics, molekuladinamikai trajektória megjelenítő szoftver

WHAM – Súlyozott hisztogram analízis módszer (Weighted Histogram Analysis Method)

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

1 Bevezetés

A XXI. századi robbanásszerű fejlődés az informatika terén lehetővé tette a mikrovilágot alkotó részek szimulációját molekuláris szinten. Az utóbbi évtizedekben a kutatók rendelkezésére álló szuperszámítógépek elérhetővé tették az egyre hosszabb szimulációs idejű molekuladinamikai (MD) számításokat, melyek segítségével számos fehérje és peptid tulajdonságait és kölcsönhatásait értettük meg közelebbről. Egy érdekes új irány a felületek és biomolekulák kölcsönhatásának tanulmányozása MD szimulációkkal. Ez a módszer lehetőséget teremt egyben arra is, hogy MD szimulációkkal vizsgáljuk a biokompatibilis anyagokat és tanulmányozzuk a felületükre letapadó biomolekulák adhéziós folyamatait. A téma azért is fontos, mert segít megérteni még pontosabban, molekuláris szinten is az orvosi és fogászati implantátum anyagok felületein lejátszódó biológiai folyamatok alapvető lépéseit.

Dolgozatom témája rövid peptid molekulák letapadásának vizsgálata titán implantátumok felületén, MD módszerek alkalmazásával. Az elmúlt évtizedekben a peptidek és a titán-dioxid (TiO_2) felületek kölcsönhatásainak tanulmányozása különösen kiemelkedő jelentőségre tett szert, mivel az ilyen típusú rendszerek számos ígéretes alkalmazási területet nyitnak meg, például a titán (Ti) alapanyagú csont-implantátumok biokompatibilitásának további javítását. A MD szimulációk lehetővé teszik, hogy molekuláris szinten vizsgáljuk ezeket a rendszereket, és megértsük a kölcsönhatások dinamikáját és a molekulák esetleges konformációs változásait.

Dolgozatomban bemutatom a titán fém felületét borító kristályos és amorf TiO_2 -t, valamint azokat a peptid molekulákat, amelyek hatással lehetnek a titán implantátumok sikeres becsontosodására (osszeintegrációjára). Ismertetem e molekulák kölcsönhatásait vizsgáló MD kutatások szakirodalomban megjelent releváns eredményeit. A kutatásaim során különböző MD szimulációs módszereket alkalmaztam arra, hogy a felület és biomolekula kölcsönhatást tanulmányozhassam, ezeket részletesen bemutatom a munkámban. Részletezem az általam használt MD módszerek paramétereit, többek között a potenciál- és erőtér beállításokat, amelyeket arra használtam, hogy TiO_2 -peptid modelleket alkossak meg és egyensúlyi állapotba hozzak. A dolgozatban ismertetett kutatás legfontosabb motivációja azon törekvés, hogy az osszeintegrációt potenciálisan befolyásoló peptidek TiO_2 felülethez történő kötődési folyamatait megismerjem,

számszerűsítsem és különböző TiO_2 polimorf struktúrákhoz való tapadásukat összehasonlítsam. Ehhez a MD szimulációk során kapott állapotok időfejlődéséből meghatároztam a peptid molekulák megtapadási folyamatait és kiszámítottam az egyes peptidek közvetlenül a felület közelében töltött idejét a teljes szimulációs időhöz viszonyítva. Továbbá speciális molekula elhúzási MD segítségével meghatároztam a vizsgálatba bevont hat peptid kötési energiáját. Dolgozatomban különös figyelmet szenteltem annak, hogy a tézispontokhoz tartozó eredmények jól elkülönítettek legyenek: ezért mindegyik tézispontot az eredmények fejezet egy-egy alfejezete támaszt alá. Az eredmények ismertetése után az értekezést a magyar és az angol nyelvű összefoglaló zárja.

2 Elméleti áttekintés, irodalmi előzmények

A doktori értekezésemben bemutatott eredmények különböző TiO_2 felületre tapadó biomolekulák MD szimulációján alapulnak. A következőkben bemutatom az ezzel kapcsolatos szakmai alapismereteket és néhány releváns szakirodalmat, amely megalapozta a munkámat.

2.1 Titán implantátumok összeintegrációja

Maga a titán fém egy igen jól megmunkálható, széles körben használtos anyag. Napjainkban számos területen alkalmazzák az iparban, de a titánnak jelentős orvosi és fogorvosi alkalmazásai is vannak, például beültethető implantátumok formájában [1-4]. A felhasználhatóság és a modellezés szempontjából egyaránt fontos ismerni a Ti anyagtani tulajdonságait, ezért az alábbiakban áttekintem néhány fontosabb tulajdonságát. Maga a Ti a fémek között inkább alacsony sűrűségűnek mondható a $\sim 4500 \text{ kg/m}^3$ (azaz $4,5 \text{ g/cm}^3$) sűrűségével. A Ti az átmeneti fémek között található a periódusos rendszerben, a rendszáma 22, azaz a teljes elektronszerkezetét tekintve $[\text{Ar}]3d^24s^2$ (vagy $1s^22s^22p^63s^23p^63d^24s^2$). A telített külső elektronhéjhoz (nemesgáz szerkezet) képest 4 további elektronja van, 2 a 3d alhéjon, 2 pedig a 4s-en, ráadásul ezek energiaszintjüket tekintve nagyon közeliak, éppen ezért a titánnak 4 vegyértékelektronja van. Az atomok elektronkonfigurációja határozza meg az anyagok fizikai és kémiai tulajdonságainak nagy részét. A Ti elektronszerkezetének megismerése segít megérteni a titánt tartalmazó anyagok szerkezetét és tulajdonságait, vagy lehetővé teheti a titánvegyületek viselkedésének előrejelzését. A Ti elektronegativitása 1,54 (Pauling-féle skálán) [5], ami a titán atomok között egy erősnek mondható, fémes kötést eredményez (229 kJ/mol [6]). Részben a magas kötési energiából (és részben a nagyobb atomi tömegből) következik az is, hogy a titánnak viszonylag nagy az olvadáspontja (1668°C) és a forráspontja (3287°C) [7], akár a többi fémhez képest is (például a réz olvadáspontja 1084°C , vagy az acélé $\sim 1400^\circ\text{C}$), az alacsony sűrűsége ellenére. A Ti atom van der Waals atomi sugara 187 pm [8], az atomi tömege pedig $47,87$, amelyből részben következik a sűrűsége. A fémek többsége köbös vagy hexagonális kristályrácsban kristályosodik [9]. A tiszta titán (szokás CP Ti-nak is nevezni, Commercially Pure) két allotróp kristály struktúrát vehet fel, ezeket alfa és béta titánnak nevezik [7]. Az alfa titán szoros illeszkedésű hexagonális kristályrácsú (HCP, Hexagonal Close-Packed), amibe

főleg szobahőmérséklet környékén kristályosodik a titán. Magasabb hőmérsékleten tércentrált köbös kristályrácsban kristályosodik (BCC, Body Centered Cubic). Mechanikai tulajdonságait tekintve, klasszikus képlékeny fém tulajdonságai vannak (képlékenysége kb. 25-40%), nagy a merevsége, szakítószilárdsága és nyomószilárdsága. Az ötvözetlen, tiszta titánt (CP Ti) különböző osztályokba (Grade) sorolják: Grade 1-től 4-ig, amelyek mechanikai tulajdonságai között jelentős eltérés lehet. További Grade osztályok is használatosak, ezek már valamilyen titán ötvözetre utalnak. A titánt más fémekkel gyakran ötvözik mechanikai tulajdonságainak javítása céljából. A leghíresebb ötvözete a Ti-6Al-4V (Grade 5), amely 90% titánt, 6% alumíniumot és 4% vanádiumot (és kb. 0,25% vasat) tartalmaz [7]. Ezt az ötvözetet, valamint a CP titánt is használják orvosi és fogorvosi célokra is [10, 11].

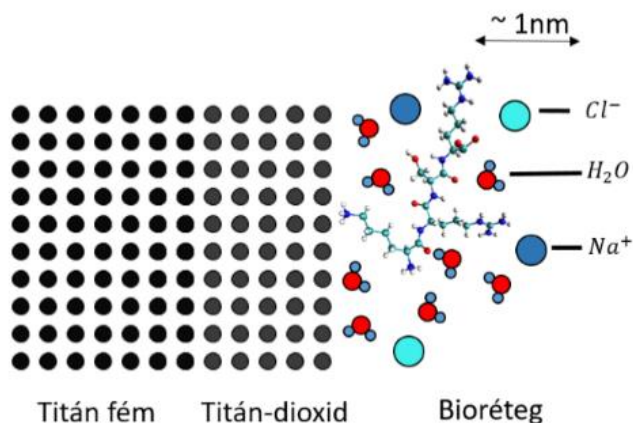
A fémeken kialakuló oxid rétegek fizikája egy rendkívül aktívan kutatott témakör manapság. A natív oxid képződése a titán felületeken fontos folyamat, amely befolyásolhatja a titán alapú anyagok korrózióállóságát és biokompatibilitását [12, 13]. A titán kapcsán fontos megemlíteni, hogy amint a levegővel érintkezik, felületén másodpercek töredéke alatt kialakul egy passzív oxid réteg [14]. Ez az oxid réteg megvédi a titánt a további korróziótól, a réteg vastagsága esztergált titán esetén néhányszor 10 nm [15]. Az oxid réteg képződését számos, akár mesterségesen is irányítható folyamat befolyásolja, például a környezet hőmérséklete, a páratartalom, vagy az oxigén koncentráció [13]. A titán felületi érdessége is befolyásolhatja az oxidképződés sebességét, a simább felületek lassabban képeznek oxidréteget, mint a durvább felületek. Az oxidképződés sebességét befolyásolhatják ötvöző komponensek vagy szennyező elemek, például szén vagy nitrogén [13]. A szakirodalom alapján az oxid réteg akár néhány 100 nm vastagságúra is növelhető, ha a fém elektrolízises felületkezelési technikával (anodizálás) megmunkálják [14]. Az oxid réteg védelmet biztosít a fém számára a további korrózióval szemben, valamint fontos szerepet játszik a titán és a biológiai szövetek kölcsönhatásában [11-13]. Definíció szerint a fémoxidok kerámiának tekinthetőek, melyek általánosságban igen jó biokompatibilitással rendelkeznek.

A titán implantátumok felületén lejátszódó biológiai folyamatok, úgymint az osztointegráció, a TiO_2 réteg és biomolekulák kölcsönhatásán alapszik. Ezen okokból is kulcsfontosságú megérteni magát a felületet és a TiO_2 tulajdonságait. Az oxigén elektronegativitása 3,44, ezért a két oxigén és egy titán atom által alkotott vegyület kötési

a fémes kötéshez képest eltolódnak kissé ionos-kovalens irányba. Ez a kevert kötés jelentős befolyással van a felületen lejátszódó kémiai és biológiai folyamatokra, továbbá a TiO_2 -nek több polimorf fázisa is ismert [16].

Az utóbbi évtizedekben az elvesztett fogak pótlására egyre szélesebb körben elterjedt a fogászati implantátumok alkalmazása. A fogászati implantátum gyakorlatilag egy mesterséges foggyökér, amit a fogorvosok az állkapocscsontba (mandibula) vagy felső állcsontba (maxilla) ültetnek be. A fogászati implantátumok ma már főleg tiszta titánból (CP Grade 4 típusú titán) vagy annak ötvözetéből (Grade 5 Ti-6Al-4V ötvözet) készülnek [11]. Köszönhetően a titán jó mechanikai tulajdonságainak, a titán implantátumok ellenállnak a rágás következtében ható erőknek [7]. A felületükön kialakuló TiO_2 réteg kompaktsága és kémiai stabilitása miatt viszont rendkívüli biokompatibilis tulajdonságokat is mutatnak [11, 12]. Használhatók egy vagy akár több hiányzó fog pótlására és különféle típusú fogpótlások támogatására, beleértve a koronákat, hidakat és fogsorokat. A műtét során az implantátum beültetésre kerül a kifűrt csontfészekbe, ahová viszonylag nagy nyomatékkel tekerik be (35 Ncm), ezzel egyfajta primer stabilitást adva az implantátumnak [17]. Az implantátum felületén ekkor a véráramból különböző alkotóelemek tapadnak meg, úgymint vízmolekulák, só ionok, peptidek, fehérjék. A hosszú távú sikeresség szempontjából igen fontos az, hogy a felületen megfelelő bioréteg alakuljon ki, ugyanis a csontsejtek (oszteoblasztok) a számukra ideális felületen megtapadva tudnak megfelelően differenciálódni és osztódni [12]. A csontosodás folyamatát oszeointegrációnak nevezik. E folyamat alatt a megtapadt csontsejtek kollagén-mentes organikus mátrixot választanak ki [18]. A mátrix fehérjék segítségével a kalcium kötőhelyeken kalcium-foszfát vegyületek fognak lerakódni, ami egyfajta kristály nukleációs folyamatot indít be a fehérjék felszínén. Az ezt követő fázisban a kristályok növekedése után történik a kollagén szintézise és a kollagén rostok mineralizációja. Az oszeointegrációs folyamatokban számos biomolekula, fehérje működik közre. A teljesség igénye nélkül ezek például az extracelluláris mátrix nem kollagén típusú fehérjéi közül az integrinek, oszteonektin, BSP (bone sialoprotein, azaz csont szialo fehérje), különböző proteoglikánok, fibronektin, BMP (bone morphogenetic protein, azaz csont morfogenetikus fehérje); a plazma fehérjék közül: albumin, immunglobulin, transferrin; a citoskeletális fehérjék közül: talin, paxillin, tensin. A kis méretű biomolekuláknak, peptideknek is szerepük van a bioréteg kialakításában, ilyen

például a szakirodalomban széles körben tárgyalt RGD (Arg-Gly-Asp) [19]. Az 1. ábra sematikusan mutatja a felületen kialakuló molekuláris kölcsönhatást. A Ti fémre egy vékony TiO_2 réteg borítja és azon megtapadnak a vízmolekulák, valamint a későbbi kölcsönhatásokban fontos szerepet játszó peptidek vagy fehérjék, ionok jelenlétében.



1. ábra: Az összeintegráció során a titán implantátum felületén víz, ionok és biomolekulák tapadnak meg.

Az implantátumok felületkezelésének és funkcionálisításának tudományos háttere folyamatosan és egyre gyorsabban fejlődik. Az egyik legfontosabb kérdés, hogy az alapvetően esztergált fém implantátum testet milyen technológiai lépések szerint kell megmunkálni, mielőtt implantátum formájában az orvoshoz vagy fogorvoshoz jut. A leggyakrabban alkalmazott módszerek a homokfűvás (sandblasting) és savmaratás (acid-etching), az így elkészített felületet nevezik SLA-nak [20, 21]. Ezzel az eljárással egy kellően érdes és porózus tulajdonságú felület alakul ki, segítve az összeintegrációs folyamatokat. A felület érdessége kulcsfontosságú, nem csak a csontsejtek tapadásának szempontjából; az implantátum nyaki részénél a baktériumok megtapadását a felület megfelelő kialakításával meg kell gátolni, mivel a baktériumok megtapadása és telepképzése az úgynevezett perimplantitiszhez, az implantátum körül kialakuló gyulladásos betegséghez vezet. Ez akár csont leépüléssel és súlyosabb esetben az implantátum elvesztésével is járhat. Alapvetően az implantátumok csontba illeszkedő részét – a gyökér részét – érdesebbre készítik, ezzel a csontsejtek számára egy olyan felületet létrehozva, amin könnyebben megtapadhatnak. Ezzel szemben a nyaki részt simára polírozzák [22], ezzel a baktériumok tapadása szempontjából kevésbé kedvező felületet hoznak létre. Az utóbbi évtizedekben előtérbe kerültek az alacsony ezüst koncentrációval jellemezhető, módosított TiO_2 felületek [23], amelyek egyfajta

antibakteriális felületet alakítanak ki, ezzel próbálva megelőzni a baktériumok elszaporodását a felületen. A felület nedvesítőképesége egy további fontos paraméter, amely jelentős befolyással van az összeintegrációs folyamatokra [11]. A jobban nedvesedő felületeken ugyanis a vér szétterül, és egyúttal magával hoz olyan fontos alkotó elemeket, amelyek bioréteget alakítanak ki. Ilyen komponensek például a glükóz, valamint különböző aminosavak, ionok, peptidek, fehérjék stb. Az implantátum felszínének lézeres kezelése ígéretes fejlesztési irány [24]. A felületet ért fókuszált sugár segítségével módosíthatók a felület anyagának fizikai, kémiai vagy akár későbbi biológiai tulajdonságai [25].

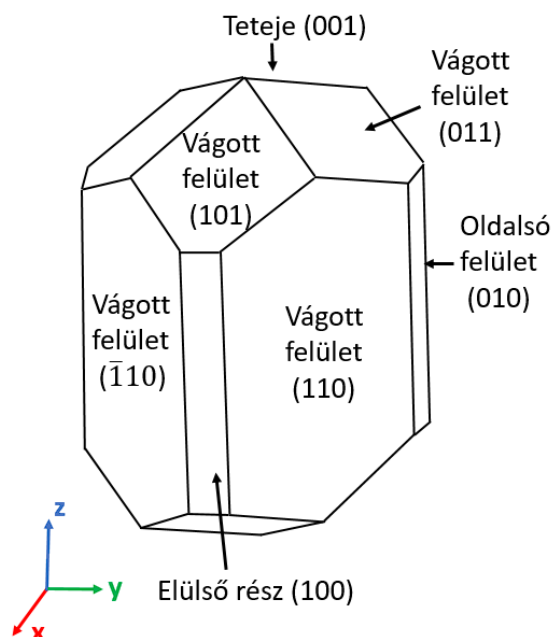
A fogászati implantátum felületein végzett fizikai és kémiai vizsgálatokkal jellemezhetők az implantátum felületének különféle tulajdonságai, mint például a korrózióállóság vagy akár a kopásállóság. Az *in vitro* vizsgálatok során laboratóriumi körülmények között végeznek speciális tenyésztő edényekben szaporított sejtekkel vagy szövetekkel vizsgálatokat. A sejt kultúrás kísérletek lehetőséget adnak arra, hogy a különböző felületkezelési módszereket - mint a homokfúvás/savmaratás és lézeres megmunkálás - összehasonlíthassuk a biokompatibilitás szempontjából. Számos kísérleti *in vitro*, sejt kultúrás eredmény mutatja azt, hogy kontroll titán felületekhez képest a rövid peptidekkel kezelt felületeken, úgymint RGD és KRSR (Lys-Arg-Ser-Arg), jelentősen nő a csontsejtek koncentrációja [19]. Ismert, hogy ezek a peptidek receptor fehérjék komponenseiként is serkentik a sejtek letapadását. Az, hogy a csontsejtek száma növekszik a különböző funkcionális felületen, azt jelzi, hogy kedvezőbb bioréteg alakult ki, ezzel az implantátumok hosszú távú sikerességének esélyeit növelve. Mireia és munkatársai korábban sejt kultúrás méréseket végeztek kontroll titán felületeken, valamint RGD, KRSR, ezek kombinációja és fibronectin fehérjével funkcionális felületeken [19]. A sejt proliferációt (osztódást) fluoreszcenciás módszerrel határozták meg, Alamar blue festéket használva. Eredményeik alapján a kezelt felületeken szignifikánsan nagyobb, többszörös sejtsűrűség (sejtszám/cm²) alakult ki a kontroll felülethez képest.

2.2 A titán-dioxid módosulatok

A titán-dioxid (kémiai képlete a TiO₂), más néven titán(IV)-oxid, vagy titania, a titán fém felületén megjelenő oxid réteg neve, amely a természetben is megjelenhet, mint

kristály. Számos ipari alkalmazása van, vékonyréteg dielektrikum tükörként, festékszínezékként, UV szűrőként egyaránt alkalmazható. A titán fémen néhány nm vastagságú TiO_2 réteg alakul ki az oxidáció során [14]. Számos polimorf állapota van, ezek közül gyakoribb kristályos formák az anatáz, rutil és brookit. Jelenleg összesen 12 polimorf szerkezete különböztethető meg, az anatáz, rutil, brookit mellett ismert az akaogiit (angolul akaogiite) és a riesit (angolul riesite), valamint normál légköri nyomáson megfigyeltek további három metastabilis fázist, nagy nyomáson, kísérleti körülmények között pedig újabb négyet [26-34]. A brookit egy ritkábban előforduló nem stabilis fázis, amely ortorombos kristályszerkezettel rendelkezik. A természetben a TiO_2 anatáz, rutil, amorf és ezek keverékének formájában található meg leginkább [13, 35]. Mindezek mellett számos alkalmazási lehetősége van az amorf TiO_2 -nek is, amelynek tulajdonságai eltérnek a kristályos TiO_2 -hoz képest [36]. A következőkben bemutatom ezen leggyakoribb fázisok elemi celláit és szerkezetét. Az elemi cella definíció szerint a kristályrács legkisebb egysége, amelynek ismétlésével az egész rács felépíthető és számos fizikai, kémiai tulajdonság következik belőle, úgymint az anyag sűrűsége vagy törésmutatója.

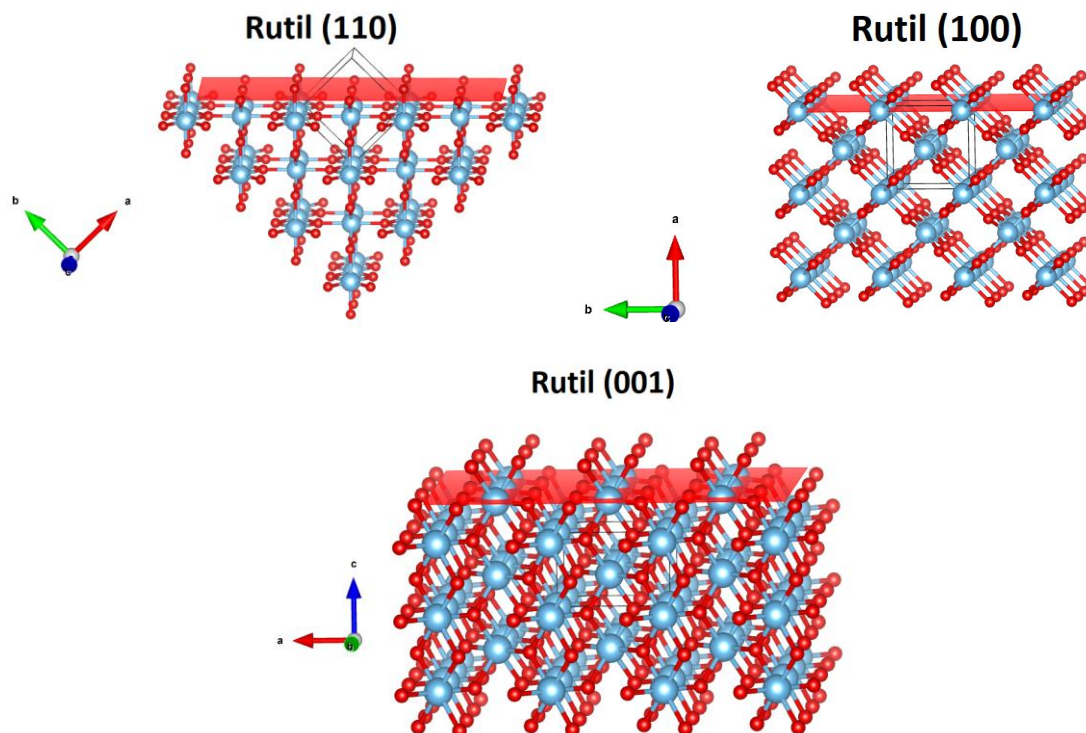
A Miller-indexek (egy számhármassal, (hkl) az általános jelölése) segítségével a kristályrács síkját és orientációját lehet meghatározni. Például az (100) azt jelenti, hogy a sík normális iránya az x tengellyel esik egybe. A Miller-indexekkel megadott rácssíkok merőlegesek arra a vektorra, amelyet a reciprokrácsban választott bázisban írunk fel ($h\mathbf{b}_1 + k\mathbf{b}_2 + l\mathbf{b}_3$, ahol $\mathbf{b}_i$ a reciprokrács bázisvektora). A Miller-indexeket úgy szokás megadni, hogy a legkisebb számot adják meg, azaz relatív prímeikkel írják fel (közös osztójuk 1). A negatív irányt felülvonással szokták jelölni negatív szám helyett (pl. -100 helyett $\bar{1}00$).



2. ábra: A TiO_2 kristálysíkok reprezentációja (Wulff construction, azaz Wulff konstrukció), az ábrán feltüntettem a Miller-indexeket is.

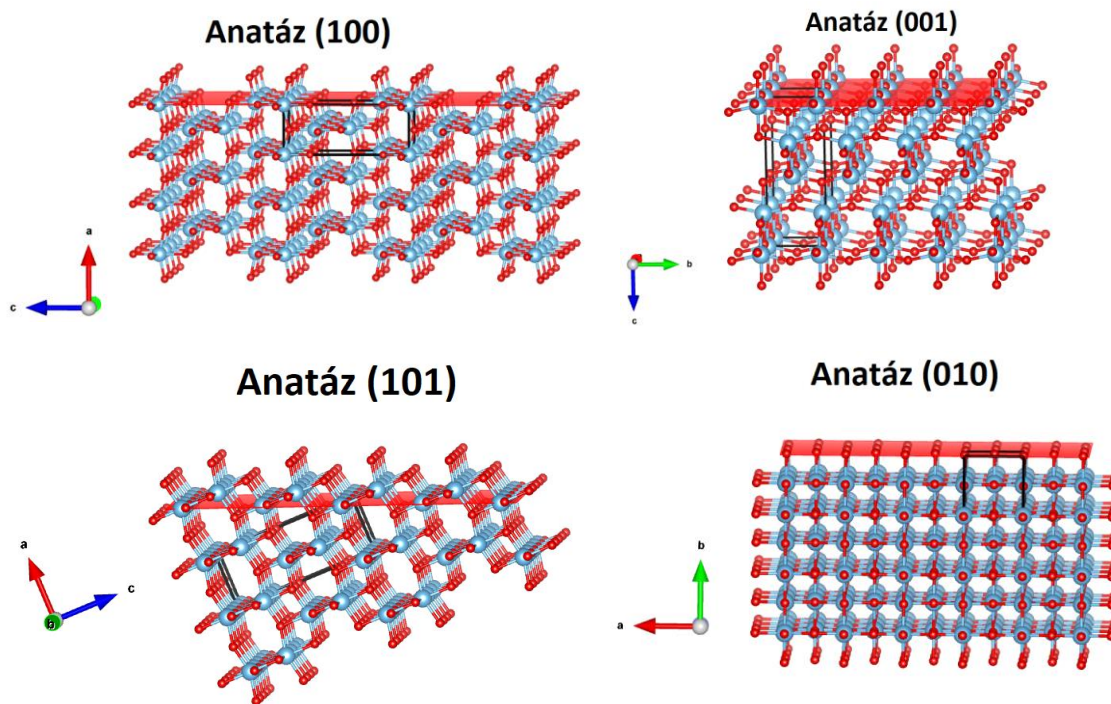
A felületen megjelenő kristálysíkokat befolyásolhatja a felületkezelés is. A 2. ábra néhány lehetséges kristálysíkot mutat TiO_2 esetén, a rajzot Ulrike és Ramamoorthy munkája alapján készítettem, valamint feltüntettem a megfelelő Miller-indexeket is [13, 37].

A rutil a TiO_2 leggyakoribb polimorf módosulata, tetragonális szerkezetű normál környezeti nyomáson és hőmérsékleten. Így a titán fém felületeken nagyon gyakran előfordul. A rutil kristály szerkezetét és a leggyakoribb felületi kristálysíkokat a 3. ábra mutatja. A rutil elemi cellája két Ti atomot és négy oxigén atomot tartalmaz. Négy egynegyed Ti atomot a sarokban, egyet közepén és két Ti atom az elemi cella sarkában található, az oxigén atomok pedig az elemi cella közepén és az oldalak közepén helyezkednek el, egyfajta oktaéderes elrendezésben. Az irodalomban a leginkább tanulmányozott rutil kristálysíkok a (001), (100) és az (110), ezek közül TiO_2 rutil esetén a (001) a leggyakoribb kristály orientáció. Rutil esetén az (110) sík rendelkezik a legalacsonyabb felületi energiával és ezért ez a legstabilabb kristály orientáció [13].



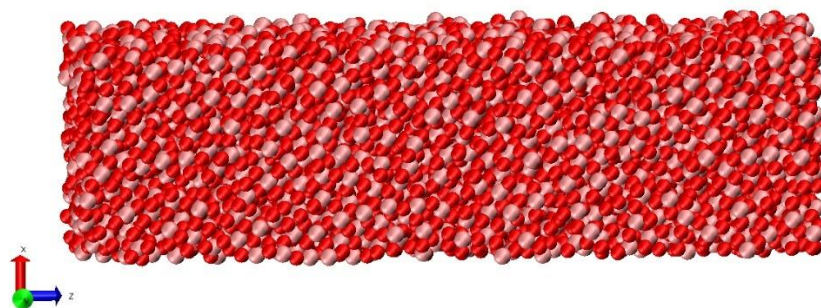
3. ábra: A leggyakoribb rutil kristály orientációk és rajta a kristálysíkok pirossal kijelölve. A képeket a Vesta 3.5.8 szoftverrel (Visualization for Electronic and Structural Analysis [38]) készítettem. Színjelölés: Oxigén: piros, Titán: kék, valamint az elemi cella feketével.

In vivo állatkísérletek során kimutatták, hogy a csontosodási folyamatok pozitívan befolyásolhatók, ha az implantátum felület anatóz szerkezetű TiO_2 -vel fedett [39]. Az anatóz egy gyakori, metastabilis fázisa a TiO_2 -nek, amelynek szintén tetragonális szerkezete van. Az anatóz kristályszerkezetét és a leggyakoribb felületi kristálysíkokat a 4. ábra mutatja. Az anatóz kristály elrendezése a rutillal szemben anizotrópiát mutat (v.ö.: 3. ábra és 4. ábra). A titán atomokhoz oktaéderes formában kapcsolódnak az oxigénatomok. Az anatóz tiszta formában színtelen vagy fehér színű, szennyeződésektől fekete színű lehet. Az anatóz fotokatalitikus tulajdonságokat és jó elektronmobilitást mutat, ezért fény hatására kémiai reakciókban katalizátor szerepet tölthet be. A Ti fém felületén megjelenő anatóz szerkezetek jellemzően (101), (100), (010) és (001) kristálysíkokkal fedettek [13]. Ezek közül termodinamikailag a legstabilabb anatóz felületű sík az (101).



4. ábra: A leggyakoribb anatáz kristály orientációk és rajta a kristálysíkok pirossal kijelölve. A képeket a Vesta 3.5.8 szoftverrel készítettem. Színjelölés: Oxigén: piros, Titán: kék, valamint az elemi cella feketével.

Az amorf szerkezet egy befagyott folyadék állapotnak tekinthető (üvegszerkezetnek is szokták nevezni). A szerkezetet alkotó atomok nem követnek szabályos, hosszú távú rendezettséget, a szerkezetben rövidtávú belső rendezettség alakulhat ki. A titán és oxigén atomok ezen szerkezetben véletlenszerűen helyezkednek el. Az amorf TiO_2 szerkezetet hasonlóan más amorf anyagokhoz többek között hőkezeléssel lehet előállítani, azaz magas hőmérsékletről hirtelen lehűtéssel. Az amorf TiO_2 fotokatalitikus, optikai, dielektromos és mechanikai tulajdonságai is eltérnek a kristályos változatokhoz képest [36, 40]. Az amorf TiO_2 szerkezetű anyagokat gyakran vékonyréteggént vagy por formájában állítják elő. Az 5. ábra az általam készített amorf TiO_2 szerkezetet mutatja, amelyet MD módszerekkel állítottam elő (lásd módszerek fejezet).



5. ábra: Az általam készített amorf TiO_2 modell VDW reprezentációban ortografikus nézetben. A képet a VMD 1.9.4 szoftverrel készítettem. Színjelölés: Oxigén: piros, Titán: rózsaszín.

2.2 Peptid molekulák

A peptidek aminosavak láncolatai, melyeket peptidkötések kötnék össze. Az aminosavak szerves vegyületek és többek között a fehérjék építőelemei is [41]. A peptidek rövidebb molekulák, mint a fehérjék, melyek általában jóval több aminosavból állnak. Általánosságban a peptidek mérete néhány aminosavtól akár 50 aminosavig is terjedhet. Azonban, ha egy bizonyos hosszt meghalad, már fehérjének tekintik. A peptidek számos biológiai folyamatban kulcsfontosságú szerepet töltenek be például a sejtek közötti kommunikációban és az antimikrobiális védekezésben. A peptidek működhetnek akár jelátviteli molekulákként is, de számos peptid hormonként is szolgál.

Az aminosav-láncok elejét és végét N-terminális (N-terminus) és C-terminális (C-terminus) névvel illetik. Ez különösen elterjedt a peptid és fehérjemolekulák esetén. Az “N” az angol “amino” szóra, a “C” pedig a karboxilcsoportra utal. Az aminosav-láncok szintézise a riboszómán mindig az N-terminálistól a C-terminális felé halad. Az N-terminális és C-terminális végek között különféle reakciók és kölcsönhatások történhetnek. Például a peptidkötések ezen részek között alakulnak ki. A peptidek elsődleges szerkezetét meghatározza, hogy milyen aminosavak építik fel őket, és milyen sorrendben.

A peptidek szerkezetét számos módszerrel meg lehet határozni. Egy ilyen módszer például a röntgenkristallográfia, ahol röntgendiffrakciós módszerrel határozzák meg a kristályosított peptid szerkezetét. Ez a módszer az egyik legpontosabb módszer, magát az eljárást már régóta használják különböző molekulák, fehérjék szerkezetének felderítésére. A peptidek szerkezetének meghatározására szintén elterjedt módszer még az NMR

spektroszkópia (nukleáris mágneses rezonancia). Az NMR nagy előnye, hogy nem igényli a peptidok kristályosítását, maga a módszer az atomok mágneses tulajdonságait használja ki. Megemlíthető még a tömegspektrometria, ami lehetővé teszi a peptid molekulák tömegének meghatározását, valamint az infravörös spektroszkópia (IR), melynek segítségével a különböző funkciós csoportok (pl. karboxilcsoport) vagy a peptidre jellemző főbb kémiai kötések meghatározhatóak. A peptidok szerkezetének ismerete fontos a biológiai szerepük és működésük feltérképezésében.

2.3 A MD számítások elméleti háttere

Az utóbbi évtizedekben lehetőség nyílt arra, hogy viszonylag nagy atomszámú rendszereket a MD módszereinek segítségével szimuláljanak. A MD szimulációk a klasszikus fizika metodikáit alkalmazva oldja meg időben az egyes atomok mozgásának leírását miközben azok egymással kölcsönhatnak. A kölcsönhatást potenciálok segítségével lehet jellemezni. Ez azt jelenti, hogy az atomokra vonatkozó Newton mozgásegyenleteket numerikus közelítésekkel oldják meg. A valóságban igen nagy számú részecske alkotja az anyagokat, ahol az anyagmennyiségét mólokban fejezzük ki; 1 mol az $6,022 \cdot 10^{23}$ darabot jelent. Fontos leszögezni, hogy a jelenlegi szuperszámítógépes számítási teljesítmény segítségével sem közelíthető meg ilyen nagy számú részecske szimulációja még egy olyan egyszerűnek mondható modellel sem, mint a klasszikus MD. A mai számítási teljesítmény mellett pár-száz ezres atomi rendszerek MD szimulációjára van lehetőség, biológiailag releváns időhosszokban; ez pár száz, esetleg ezer ns lehet (például egy fehérje molekula feltekeredése [42, 43]). A MD módszereket manapság elsősorban biomolekulák vizes környezetbeli szimulációjára használják, például különböző fehérjék szimulációjára vagy akár molekula dokkolás ellenőrzésére [44]. A molekuladinamikai szimulációknak vannak korlátai, amelyeket mindenképpen figyelembe kell venni, mivel a kvantummechanikán alapuló jelenségeket, amelyekben az elektronok vesznek részt, nem tudja kezelni, így a kémiai kötések kialakulását sem tudja leírni. Az ezeket a jelenségeket figyelembe vevő, úgynevezett *ab initio* módszerek (Hartree-Fock és sűrűségfukcionál elmélet) viszont sokkal nagyobb számítási teljesítményt igényelnek. Ezekkel a módszerekkel jelenleg nincs lehetőség pár száz atomnál nagyobb rendszerek szimulációjára. Számos ingyenesen elérhető szoftvercsomag áll rendelkezésre, amelyekkel elvégezhetőek a MD szimulációk és az eredmények analízise, ilyen például a NAMD [45] vagy a széleskörben használt

GROMACS [46-54]. A fémek és fémoxidok potenciáljának ismeretében lehetőségünk van a felületeken zajló folyamatok szimulációjára is a MD szimulációk keretén belül [55-58].

A MD számítások során az algoritmus megvizsgálja azt a V potenciált, amivel egy adott részecske (atom) jellemezhető és kiszámítja az egyes részecskék közötti potenciál negatív gradiensét, amely megadja az $\mathbf{F}$ erőt:

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

ahol ∇ a Nabla operátort jelöli, ami a különböző irányokba vett parciális deriválást jelöli, $V(\mathbf{r}(t))$ a potenciálfüggvény, amely függ a helytől és időtől. Ez a potenciálfüggvény határozza meg a kölcsönhatásokat a részecskék között. Elméletben az adott részecskére a környezetéből az összes részecske által kifejtett potenciált vesszük, a gyakorlatban a MD számítások során, hogy gyorsabban fusson az algoritmus ~ 1 nm-nél szokás egy határt meghatározni, ezen a távolságon túl a további részecskék járuléka elhanyagolhatóan kicsi. A részecske $\mathbf{a}$ gyorsulása meghatározható az erő és a részecske m tömege segítségével, Newton második törvényének felhasználásával:

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

A gyorsulás megadja a sebesség változását az adott időegység alatt, azaz $\mathbf{a} = \frac{d\mathbf{v}}{dt}$, a sebesség segítségével pedig felírhatjuk, hogy egy adott részecske pozíciója mennyit változott időegység alatt, azaz $\mathbf{v} = \frac{d\mathbf{r}}{dt}$. Mindezt behelyettesítve az (1) és (2) egyenletekbe adódik a következő differenciálegyenlet:

$$m \cdot \frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2} = -\nabla V. \quad (3)$$

A MD szimuláció során a feladat ezen egyenlet megoldása az összes részecskére. Ezt a differenciálegyenletet a sok részecske által alkotott rendszerekben csak numerikus módszerekkel, közelítésekkel lehet megoldani. Az egyik legfontosabb közelítés, az időlépésköz megválasztása, azaz $dt \sim \Delta t$. Ez egyben meghatározza azt is, hogy mely időpontokban oldjuk meg az egyenleteket. Két szomszédos időpont között történik a részecske elmozdulása v sebességgel. A MD szimulációk során ez az időlépésköz a $\Delta t \sim 1$ fs nagyságrendbe esik tipikusan, amellyel a molekulák rezgései is nyomon követhetőek kellő időbeli felbontással (egy ilyen rezgés tipikusan ~ 100 fs nagyságrendbe esik). A

bakugrás (Leapfrog) és a Verlet módszerek a legszélesebb körben használt algoritmusok a MD szimulációk időbeli megoldására.

2.3.1 Bakugrás algoritmus

A (3)-as egyenletet numerikus módszerek során közelítve oldjuk meg, csak bizonyos pontokban, diszkrét időkülönbségek esetén. Jelölje $\mathbf{r}(t)$ a koordinátát a t -edik időpontban, a feladat, hogy megtaláljuk az $\mathbf{r}(t + \Delta t)$, a $t + \Delta t$ -edik időpontban a részecske koordinátáját, a részecske elmozdulása: $\mathbf{r}(t + \Delta t) - \mathbf{r}(t) = \Delta \mathbf{r}$. A MD szimulációt végző szoftverek esetén az egyik alap időfejlesztő numerikus módszer beállítás a bakugrás algoritmus szokott lenni. A módszer lényege, hogy a következő időpontbeli koordinátát megadja, amelyhez az aktuális időpillanatbeli $\mathbf{r}(t)$ koordinátára van szükség, továbbá a sebességre fél időlépésközzel az aktuális időpont előtt és az adott időpontbeli erőre (valamint a részecske tömegére). Így a részecskék sebessége mindig fél lépésközönként kerülnek meghatározásra, a koordináták pedig egy egész lépésközönként. A sebesség a következőképpen írható fel:

$$\mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m}\mathbf{F}(t), \quad (4)$$

ahol az erő az (1)-es egyenletnek megfelelően a potenciálok alapján kerülnek kiszámításra. Az új koordinátát pedig ezt felhasználva kapjuk:

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \Delta t \cdot \mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right), \quad (5)$$

A (4). egyenletet behelyettesítve (valamint a $\mathbf{r}(t - \Delta t)$, visszafele lépést kihasználva), felírható a következő módon is:

$$\begin{aligned} \mathbf{r}(t + \Delta t) &= \mathbf{r}(t) + \Delta t \cdot \left[\mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m}\mathbf{F}(t) \right] = \\ &= 2\mathbf{r}(t) + \mathbf{r}(t - \Delta t) + \frac{\Delta t^2}{m}\mathbf{F}(t) + \mathcal{O}(\Delta t^4). \end{aligned} \quad (6)$$

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

2.3.2 Verlet algoritmus

A Verlet-féle sebesség módszer (Velocity Verlet) esetén csak Δt egészszámú többszöröseinél kerül meghatározásra az $\mathbf{r}$ koordináta és a $\mathbf{v}$ sebesség, és nincs szükség

a fél lépéseknél meghatározott mennyiségekre. Az új koordinátákat és sebességeket a következő módon kaphatjuk meg ebben az esetben:

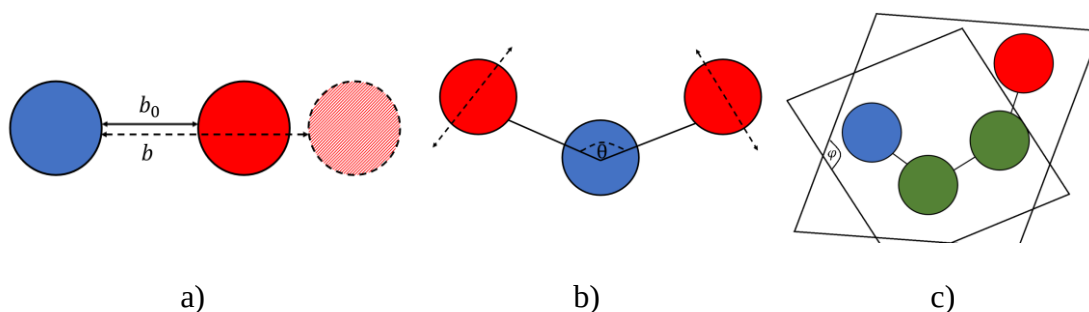
$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \Delta t \cdot \mathbf{v}(t) + \frac{\Delta t^2}{2m} \mathbf{F}(t) , \quad (7)$$

$$\mathbf{v}(t + \Delta t) = \mathbf{v}(t) + \frac{\Delta t}{2m} [\mathbf{F}(t) + \mathbf{F}(t + \Delta t)] . \quad (8)$$

Különösebb megkötések nélkül, megfelelő kezdeti felételek mellett, a Verlet és bakugrás módszer azonos MD trajektóriákat (a részecskék időbeli mozgását tartalmazó adattömböt) fog eredményezni, azaz a két módszer ekvivalens. A MD szimulációs szoftverekben, mint a GROMACS is, tetszőlegesen lehet választani a két módszer közül.

2.3.3 MD erőkterek és topológia

Számos potenciál paramétercsomag elérhető a MD szimulációk számára, amelyek tartalmazzák a potenciál paramétereket. Ezeket hívják erőtér (FF, Force Field) vagy topológia fájloknak. Ilyen széles körben használt potenciál paraméter csomag a CHARMM [59] vagy a GROMOS [60]. Ezek a csomagok tartalmazzák az egyes atomok potenciál paramétereit, amelyek eltérőek lehetnek még különböző aminosavak esetében is. A potenciál paraméterek az atomok térbeli elrendeződéseitől, a kötések geometriai kényszereitől is függenek. A 6. ábra mutatja sematikusán a kötést leíró különböző potenciál tagokat. A kötést leíró tagok legegyszerűbb esetben például harmonikus potenciál segítségével írhatóak fel. A legelső a) ábrarész mutatja a két atomot összekapcsoló harmonikus potenciált, amely során az egyensúlyi távolsághoz képest megváltozik a két atom közötti távolság (rugó modell). A b) rész ábra mutatja a hajlítást 3 atom esetén, a c) pedig a három-három atom (kék-zöldek és piros-zöldek) által kijelölt sík elcsavarodását.



6. ábra: A különböző molekula kötésben szerepet játszó potenciál járulékok. Az a) ábra két atom által alkotott molekula kötéshossz változását mutatja, a b) ábra a hajlítást

mutatja 3 atom esetén, a c) ábra 4 atom által közbezárt két sík közötti torziót mutatja (a kék és zöldek alkotnak egy síkot, valamint a zöldek és piros egy másikat).

A potenciál paraméterek magukba foglalják az elektrosztatikus V_C Coulomb tagot, a van der Waals kölcsönhatást leíró V_{LJ} Lennard-Jones potenciált, valamint a specifikus molekulakötést jellemző különböző tagokat:

$$V_C = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}, \quad (9)$$

$$V_{LJ} = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right], \quad (10)$$

$$V_k = \frac{1}{2} k_b (b - b_0)^2, \quad (11)$$

$$V_\theta = K_\theta (\theta - \theta_0)^2, \quad (12)$$

$$V_{\text{diéderes szög}} = K_\varphi (1 + \cos(n\varphi - \delta)), \quad (13)$$

$$V_{\text{improper}} = K_\psi (\psi - \psi_0)^2, \quad (14)$$

$$V_{\text{Urey-Bradley}} = K_{UB} (r_{1,3} - r_{1,3;0})^2, \quad (15)$$

ahol (9) és (10)-es egyenletek a kötéshez nem hozzájáruló tagok (non-bonded interaction), a molekula kötések (internal, bonded interaction) leíró tagok pedig a (11) - (15) egyenletek. A Coulomb potenciált leíró (9)-es egyenletben q_i és q_j az i -edik és j -edik részecske töltése (vagy parciális töltése), r_{ij} a közöttük lévő távolság, ϵ_0 pedig a vákuum dielektromos állandója. A van der Waals kötést leíró (10)-es Lenard-Jones egyenletben megjelenik ezek mellett az ϵ_{ij} , a kölcsönható potenciálvölgy mélysége, valamint a σ_{ij} , a két atom nyugalmi távolsága. A kötéshossz változásával kapcsolatos (11) tagban a k_b a kötési állandó, b_0 az egyensúlyi kötéstávolság és b az aktuális kötéshossz (két atomtól származó járulék). A (12)-es egyenlet írja le a molekula hajlítását, ahol θ a hajlás szöge, K_θ az ehhez tartozó erőállandó, θ_0 pedig az egyensúlyhoz tartozó kötésszög (három atomtól származó járulék). A (13)-as egyenlet írja le a diéderes szög járulékot (dihedral, szokás még torsion, azaz torziós szögnek is nevezni), amely négy atom esetén írható fel (és ezek két síkba esnek, 3-3 atom határoz meg egy síkot). A K_φ a diéderes szög megváltoztatásához szükséges erőállandó, φ a két sík által bezárt szög, δ a minimumhoz tartozó szög, n pedig a multiplicitás (az energiaminimumok számát mondja meg a periodikus potenciálban). A (14)-es egyenlet szintén a csavarással kapcsolatos, arra hivatott, hogy a nem megfelelő diéderes szög elfordulásokat kiküszöbölje (improper

dihedral), síkban tartsa a megfelelő csoportokat, amelyet szintén egy négyzetes összefüggéssel szoktak felírni első közelítésben. A kifejezésben a K_ψ kötési erőállandó található (egyfajta merevség), valamint a ψ_0 egyensúlyi szöge, és ψ a csavarodás szöge. A CHARMM erőterben szokás még egy további harmonikus tagot is felírni, amelyet a (15)-ös egyenletben adtam meg, ezt hívják Urey-Bradley potenciál tagnak. A potenciál 3 atomtól származó járuléka, K_{UB} a Urey-Bradley kötési erőállandó a 3 atomra nézve, $r_{1,3,0}$ az első és utolsó atom kötési távolság nyugalomban, $r_{1,3}$ pedig az aktuális kötéstávolság közöttük.

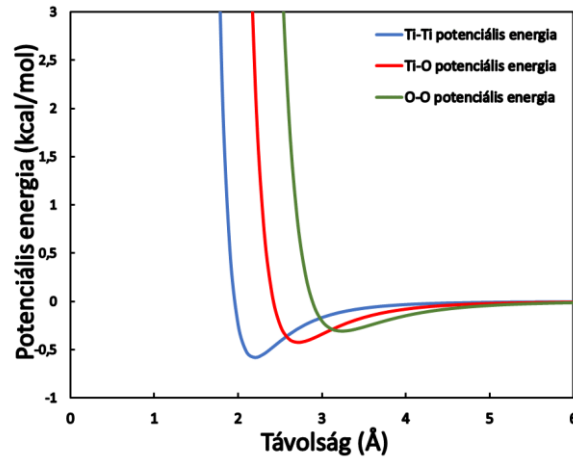
Az erő kiszámításához tehát az összes részecskétől származó potenciál járuléka összegét kell venni, amik a (9)-(15) egyenletekben szerepelnek és venni a negatív gradienst a teljes potenciálnak, azaz $V = V_C + V_{LJ} + V_k + V_\theta + V_{diéderez\ szög} + V_{improper} + V_{Urey-Bradley}$ -nek.

Érdemes megemlíteni, hogy a különböző potenciál tagokat különböző közelítésekben dolgozták ki. A van der Waals kölcsönhatást leíró tag, egy másik széles körben alkalmazott közelítése a Buckingham potenciál:

$$V_{Bh} = A_{ij} \exp(-B_{ij}r_{ij}) - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6}, \quad (16)$$

amely egy exponenciális és egy további, a távolság mínusz hatodik hatványával írja le a kölcsönhatást. A kifejezésben A_{ij} , B_{ij} és C_{ij} , választható paraméterek, amelyek az i és j részecske kölcsönhatását írják le. Ezeknek fizikai jelentésük nincs, a potenciál lefutását befolyásolják.

Az erőter fájlok nem tartalmazzák a fémek és fémoxidok többségének potenciál paramétereit. A MD szimulációk számára definiáltam a TiO_2 Lennard-Jones és Coulomb potenciál paramétereit Luan és munkatársai által közölt korábbi cikke alapján [55]. A következő értékeket használtam: $\varepsilon_{Ti-Ti} = 0,58 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$, $\varepsilon_{Ti-O} = 0,424 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$, $\varepsilon_{O-O} = 0,31 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$, $\sigma_{Ti-Ti} = 0,220 \text{ nm}$, $\sigma_{Ti-O} = 0,272 \text{ nm}$, $\sigma_{O-O} = 0,324 \text{ nm}$, $q_{Ti} = 2,196 e$, $q_O = -1,098 e$. Itt e az elektron töltését jelöli. Az ezen paraméterekkel megadott Lennard-Jones potenciál a 7. ábrán látható görbét veszi fel:



7. *ábra:* A MD szimulációknál használt TiO_2 Lennard-Jones potenciál a távolság függvényében.

Ha nincs megadva előre két különböző atom közötti potenciálérték, akkor a Lorentz-Berthelot kombinációs szabályt lehet alkalmazni, amely a kettő átlagát veszi:

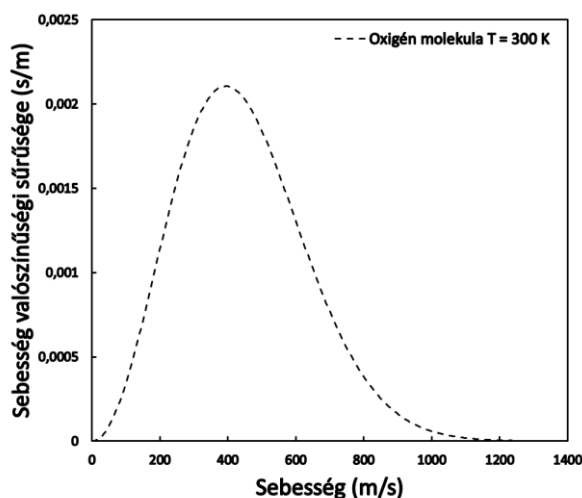
$$\begin{aligned}\sigma_{ij} &= \frac{1}{2}(\sigma_{ii} + \sigma_{jj}), \\ \varepsilon_{ij} &= \sqrt{\varepsilon_{ii}\varepsilon_{jj}}.\end{aligned}\tag{17}$$

2.3.4 Sebesség definiálása, hőmérséklet és nyomáscsatolás

Az első MD szimuláció megkezdésekor, ha még nem áll rendelkezésre az egyes atomok sebessége, akkor a Maxwell-Boltzmann eloszlásnak megfelelően kerülnek kiosztásra azok. A Maxwell-Boltzmann eloszlást leíró formula:

$$f(v_i) = \left(\frac{m_i}{2\pi kT}\right)^{\frac{3}{2}} 4\pi v_i^2 \exp\left(-\frac{m_i v_i^2}{2kT}\right),\tag{18}$$

ahol $f(v_i)$ a sebesség valószínűségi sűrűsége, m a részecske tömege, k a Boltzmann-állandó, T az abszolút hőmérséklet, v pedig a részecske sebessége. A 8. ábra mutatja az oxigén molekula esetén a sebesség eloszlását $T = 300$ K szobahőmérsékleten. Látható, hogy ez egy aszimmetrikus ferde eloszlás, az átlagsebességet a jól ismert kinetikus gázelméletbeli formulával kaphatjuk meg, ami ebben az esetben: $\bar{v} = \sqrt{\frac{3kT}{m}} = 482,57$ m/s.



8. ábra: Az Oxigén molekula sebesség eloszlása a Maxwell-Boltzmann eloszlás szerint szobahőmérsékleten ($T = 300\text{ K}$).

A MD szimulációk annak érdekében, hogy a hőmérsékletet megfelelően kezeljék és a rendszer stabil legyen, a szimuláció alatt különféle termosztát-csatolásokat alkalmaznak. Ezek a módszerek segítenek abban is, hogy a rendszer hőmérséklete beálljon az előírt értékre. A hőmérséklet kívánt értéken való tartásához elméletben egy nagyobb rendszerrel, a hőtartállyal folytat hőcserét a szimulált rendszer. Az idő előrehaladtával a szimulált rendszer felvesz egy termikus egyensúlyi állapotot, ekkor a hőtartállyal a hőmérséklete megegyezik. Ezen módszerek a legtöbbször a részecskék sebességét skálazzák, mivel a kinetikus gázelmélet alapján a hőmérséklet és a sebesség között kapcsolat van. Ilyen, a MD kapcsán széles körben elterjedt termosztát-csatolási módszer a Berendsen termosztát, a Nosé-Hoover termosztát, vagy a V-rescale termosztát.

A Berendsen termosztát az egyik leggyakrabban használt termosztát-csatolási módszer. A szimulált rendszer T hőmérsékletének eltérése fokozatosan korrigálódik T_0 referencia hőmérséklethez, amellyel egy állandó hőmérsékletű tartályhoz való csatolást modellez. A Berendsen termosztát-csatolási módszer a következő összefüggést használja [61]:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau}, \quad (19)$$

amely egy exponenciális összefüggést fog adni a hőmérséklet időbeli lefutására és τ lesz az időkonstans, ami meghatározza az időbeli lecsengést, tipikus értéke $\tau \sim 0,1\text{ ps}$.

Egy másik, gyakran használt termosztát-csatolási módszer a V-rescale, azaz a sebességek újraszkalázása. Az alapötlet az, hogy bizonyos τ időközönként új sebességeket ad meg a részecskéknél azok aktuális sebessége és egy λ szorzófaktor segítségével [61]:

$$\mathbf{v}_{új} = \mathbf{v}_{régi} \cdot \lambda \quad (20)$$

$$\lambda = \sqrt{\frac{T_{elérni\ kívánt}}{T(t)}}. \quad (21)$$

Szimulációim során én is ezt a módszert használtam.

A MD szimulációk rendszerének nyomás szabályozása céljából barosztát módszereket is bevezettek. Ezek hasonlóan, mint a termosztát-csatolás, egy külső nyomástartályhoz való csatolást jelentenek. A legelterjedtebb módszerek a Berendsen barosztát, a Parinello-Rahman barosztát és a Martyna-Tuckerman-Tobias-Klein (MTTK) barosztát. A Berendsen barosztát, hasonlóan a Berendsen termosztát módszerhez, a következő differenciálegyenlettel írható fel:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_P}, \quad (22)$$

csak most a P nyomásra kifejezve szerepelnek a mennyiségek a hőmérséklet helyett, ahol P_0 a referencianyomás értéke, τ_P pedig nyomás-csatolási időállandó. A Berendsen barosztát algoritmus ennek az összefüggésnek megfelelően skálázza újra a szimulációs dobozt meghatározó méreteket és atomok koordinátáit. Az általam készített MD szimulációk során a Parinello-Rahman barosztát módszert alkalmaztam, amely egy további sebességfüggő súrlódási tagot tartalmaz a mozgásegyenletben:

$$\begin{aligned} \frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2} &= \frac{\mathbf{F}}{m} - M \frac{d\mathbf{r}}{dt}, \\ M &= \mathbf{b}^{-1} \left[\mathbf{b} \frac{d\mathbf{b}'}{dt} + \frac{d\mathbf{b}}{dt} \mathbf{b}' \right] \mathbf{b}'^{-1}, \end{aligned} \quad (23)$$

ahol $\mathbf{b}$ a szimulációs doboz alakját és méretét jellemző vektorok mátrixba rendezve.

2.4 Biomolekulák adhéziójának számítógépes modellezése

A szakirodalomban jellemzően az utóbbi 10 évben jelentek meg olyan eredmények, amelyek MD szimulációs módszerek alkalmazásával különböző TiO_2 (például rutil, anatáz vagy akár amorf) felületre aminosavak, biomolekulák adhézióját írják le [55, 56, 58]. Kiemelt figyelmet kapott az RGD tripeptid titán oxid felületre való tapadásának

vizsgálata vizes környezetben [62-66]. Ezen elméleti kutatások segítenek megérteni azt, hogy az összeintegráció legelső lépesei hogyan zajlanak, milyen molekuláris folyamatok tesznek egy felületet sikeresebbé a biointegráció szempontjából. A következőkben azon közlemények eredményeit foglalom össze röviden, amelyek szorosan kötődnek az értekezésem tématerületéhez.

Matsui és Akaogi kiszámítottak egy potenciál modellt, amely általánosságban használható az összes TiO_2 polimorfra [57]. Luan és munkatársai ezt a potenciált átírták a szokásos Lennard-Jones kifejezésre egy függvényillesztéssel, majd megvizsgálták MD szimuláció segítségével egy általuk alkotott amorf TiO_2 nanorészecskén a HSA fehérje (Human Serum Albumin) tapadását [55]. Az elméleti eredményeikkel összevonták a kísérleti eredményeket, amelyek így módon validálták a MD szimulációkban alkalmazott TiO_2 potenciált. A saját szimulációim során én is ezeket a TiO_2 potenciál paramétereket használtam.

Xue és munkatársai a MD szimulációikkal aminosavak kölcsönhatását vizsgálták egy TiO_2 nanorészecske modell segítségével, valamint ssNMR és AFM kísérleti módszerekkel vetették össze eredményeiket [65]. Az Arg, Lys, Asp aminosavak paramétereit a CHARMM36 erőter segítségével adták meg. A rutil (110) kristálysíkú TiO_2 nanorészecske potenciálját a Predota által kidolgozott módosított TiO_2 paraméterei alapján írták le [67]. A MD számolásaik egyik legfontosabb eredménye, hogy az egyszerű aminosavak is többféleképpen tudnak megtapadni a felületen. Szimulációik során például az Arg aminosav két-típusú tapadást mutatott, vagy a guanidin csoporton keresztül (CH_5N_3) vagy az aminocsoporton keresztül. Az általam készített szimulációk során is számos peptid tapadási típust figyeltem meg.

Liu és munkatársai szintén egy TiO_2 nanorészecske modellt készítettek, amelyen a standard húsz aminosav kölcsönhatását vizsgálták a vizes környezet figyelembevételével [56]. Megfigyeléseik szerint fontos szerepet játszanak a kölcsönhatás során az egyes aminosavak töltött részei. Egy PMF (Potential of Mean Force, azaz az átlagos erőből származtatott potenciál) számolást is készítettek umbrella sampling módszerrel kiegészítve (9-11 darab 20 ns mintavételezéssel), amely során azt találták, hogy az Arg képes közvetlenül megtapadni a TiO_2 nanorészecske felületén és a Lys úgyszintén, egy bizonyos energia küszöb értéket megeléve. A többi aminosav leginkább egy és két

vízrétegen keresztül tudott megtapadni. A felületre tapadás valószínűsége jelentős eltéréseket mutatott: 0,5 nm-en belül a töltött aminosavak jelentősen nagyobb értéket értek el (Arg ~22,5%, Lys ~19%, Glu ~7,5%, Asp ~13%), mint a többi aminosav (<2,5%). A számolt kötési szabadentalpia értékek néhány kJ/mol nagyságrendbe estek (néhányszor ~0,01 eV), a legnagyobb érték pedig ~15 kJ/mol (azaz 0,15 eV) volt.

Song és munkatársai az RGD tripeptid tapadását vizsgálták rutil felületen MD módszerrel a vizes környezetet figyelembe véve [63]. Fontos eredményük, hogy a 8 ns szimulációjuk során az RGD az aminocsoporttal és karboxilcsoporttal tapad meg a TiO₂ felületen és megállapították, hogy a kölcsönhatást az elektrosztatikus (Coulomb) és van der Waals potenciál tagok írják le. A tökéletes kristálystruktúra mellett felületi hibákat tartalmazó modell felületeket is készítettek (bemélyedések, vakanciák). Az RGD ezeken a felületeken sikerebben tudott megtapadni. Az általuk kiszámított adszorpciós energia 59,28 kcal/mol (azaz 2,57 eV) a tökéletes rutil felületen, a hibát tartalmazó felületen pedig 106,14 kcal/mol és 237,78 kcal/mol (azaz 4,6 eV és 10,31 eV) volt.

A MD számításokon kívül több más elméleti módszer is lehetőséget ad kis biomolekulák és felületek kölcsönhatásának tanulmányozására, ezek közül a legfontosabbak a kvantumkémiai módszerek [64, 68, 69]. Ekkor nyomon követhető az elektronszerkezet változás, vagy a kémiai kötések kialakulása, azonban ezek a módszerek nem veszik figyelembe a hőmérsékletet vagy az esetek többségében a vízmolekulák jelenlétét. A PhD témámhoz leginkább kötődő munkát Sowmiya és munkatársai publikálták: sűrűségfunkcionál (Density Functional Theory, DFT) számításokat végeztek az RGD tripeptid anatóz (001) TiO₂ felületre való kötődésének leírására [64]. Számos RGD molekula konformációt megvizsgáltak, valamint több kicserélődési-korrelációs funkcionállal is elvégezték a számolásokat. Eredményeik azt mutatják, hogy kötési energiában jelentős eltérés lehet az egyes molekula konformációk között, valamint a különböző funkcionálok esetén. Számolásaik során a legnagyobb kötési energiák az 1,4 eV – 1,6 eV (32,3 kcal/mol és 36,9 kcal/mol) nagyságrendbe estek.

3 Célkitűzések

Doktori munkám célja különböző TiO_2 felületeken peptidek adhéziójának vizsgálata elméleti módszerekkel. Ezt a célt különböző MD szimulációkkal értem el.

- 1) Céлом volt az irodalomban eddig nem vizsgált, az összeintegráció szempontjából perspektivikus peptidek adhézióját tanulmányozni titán implantátum modell felületen. Sejtkultúra kísérletek során már bizonyítottan pozitív hatást kifejtő újabb molekula a KRSR (Lys-Arg-Ser-Arg) tetrapeptid. Ezért ezt a bioaktív tetrapeptid molekulát választottam ahhoz, hogy megvizsgáljam kristályos TiO_2 felületre való tapadását hagyományos szuperszámítógépes MD szimulációkkal, a MD szimulációs eszköztárat felhasználva.
- 2) További céлом volt egyszerű tri- és tetrapeptidek kölcsönhatásának vizsgálata gyakori kristályos TiO_2 polimorf és amorf TiO_2 szerkezetű felületekkel. Ehhez a szobahőmérsékleten leggyakrabban előforduló két kristálmódosulat, az anatáz és a rutil, valamint az amorf szerkezetű TiO_2 számítógépes modelljét terveztem elkészíteni. A KRSR és az irodalomban korábban vizsgált RGD mellett ezek módosított változatainak (LRSR és RSR, illetve KGD és LGD) a tapadását szándékoztam megvizsgálni a modell TiO_2 felületekre. Célul tűztem ki, hogy olyan paramétert találjak a szimulációs eredmények alapján, amellyel szisztematikusan össze tudom hasonlítani a vizsgálatba bevont peptidek kötődését a különböző kristályos és amorf TiO_2 felületekre. Céлом volt továbbá meghatározni a kötéseket jellemző energia értékeket, amelyhez szükséges volt egy olyan speciális MD szimulációs receptúra kidolgozása, amely a nagyobb számú molekula és több fajta felület esetében is alkalmazható az elérhető számítási teljesítményt figyelembe véve.

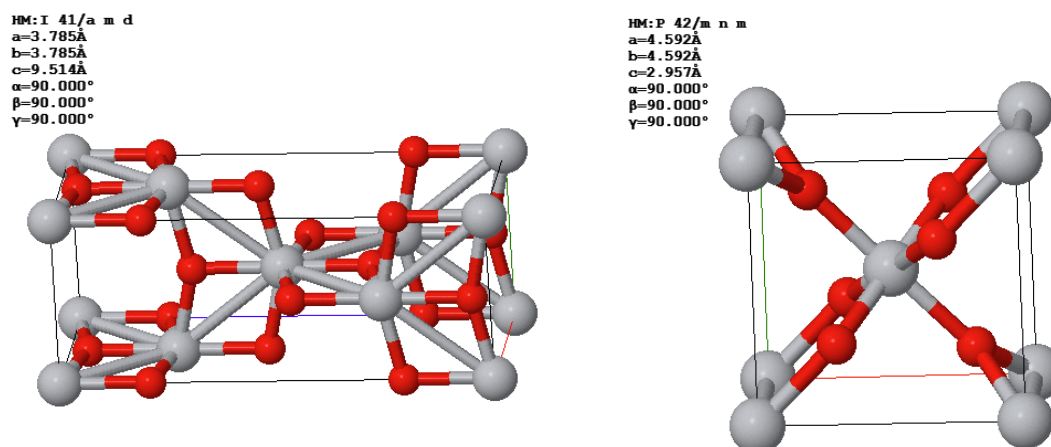
Összegezve meg kívántam ismerni, a MD számítások segítségével, hogy az összeintegrációt segítő perspektivikus biomolekulák milyen módon hatnak kölcsön a tipikus, oxiddal borított titán implantátum felületekkel. Ezt az a távlati lehetőség motiválta, hogy a molekulák és a felületek közötti kölcsönhatások célzottan irányíthatók legyenek a felület módosításával, és a molekula kiválasztásával.

4 Módszerek

Ebben a fejezetben bemutatom a kutatásaim során alkalmazott módszereket, szimulációs protokollokat. A TiO_2 és a felületére tapadó peptidek, biomolekulák kutatása céljából MD szimulációkat készítettem. A nagy számítás igényű MD szimulációkat a debreceni szuperszámítógépen (Debrecen2) végeztem el. A szuperszámítógépes kapacitást az KIFÜ (Kormányzati Informatikai Fejlesztési Ügynökség) HPC (High-Performance Computing) program keretében vettem igénybe a „Fogászati implantátum felületek és polipeptidek kölcsönhatásának molekuladinamikai és kvantumkémai modellezése” projekt címen.

4.1 Az általam használt MD szimulációs rendszerek

A kristálystruktúrákra jellemző, leginkább röntgendiffrakciós mérési eredményekből származtatható, úgynevezett elemi cellák adatai elérhetőek az AMCSD-nél (American Mineralogist Crystal Structure Database), azaz az amerikai ásványtani kristály struktúra adatbázisból. Az anatáz elemi cellához Howard és munkatársai által publikált 1991-es eredményeket használtam [70]. A rutil elemi cellához Swope és munkatársai által leközölt eredményeket vettem alapul [71]. Az anatáz és rutil két különböző tetragonális szerkezete a TiO_2 -nek, a használt elemi cellákat a 9. ábra mutatja.

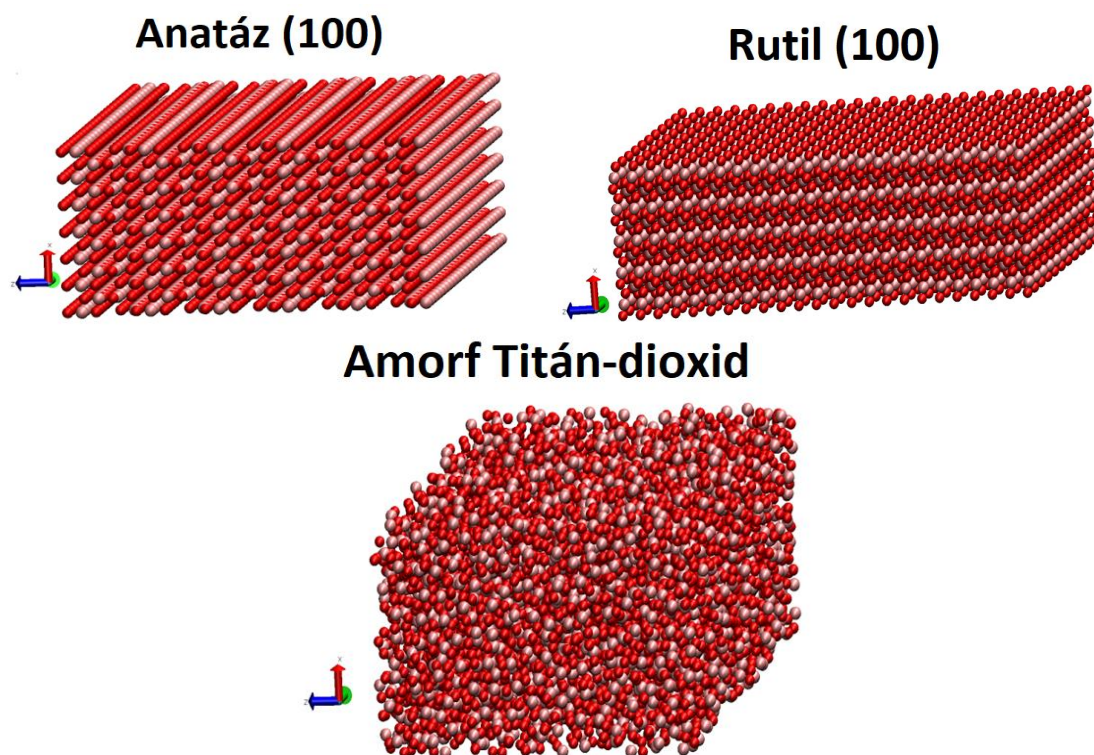


9. ábra: A vizsgálataim során alkalmazott anatáz (bal oldal) és rutil (jobb oldal) TiO_2 elemi cellák, színjelölés: szürke: titán atom, piros: oxigén atom. A grafikákat a JMOL webes megjelenítő szoftverrel készítettem.

Az elemi cellákat az Olex2 szoftverrel állítottam össze, amely segítségével az elemi cellák ismétlésével megépíthető a TiO_2 kristály struktúra [72]. Az amorf TiO_2 szerkezetet

az anatáz kristály struktúrából kiindulva készítettem el. A csak anatáz titán és oxigén atomokat alkotó rendszer hőmérsékletét beállítottam 3000 K-re, hasonlóan, mint ahogy az Luan és munkatársai publikációjának módszerek részében olvasható [55]. Ezen a rendszeren először egy 2 ns NVT és 0,25 ns NPT egyensúlyi állapot keresés szimulációt végeztem majd egy rövid, 0,5 ns MD szimuláció után a rendszer hőmérsékletét átállítottam 310 K-re, ezzel elérve, hogy hirtelen befagyjon egy folyadékszerű állapotba, amely egy amorf szerkezetű TiO_2 -t eredményezett. Ezen a hőmérsékleten megismétltem a 2 ns NVT és 0,25 ns NPT szimulációkat majd egy 2,5 ns MD szimulációt végeztem az amorf TiO_2 rendszeren. A szimulációkhoz az időlépésközt 2 fs-nak választottam meg.

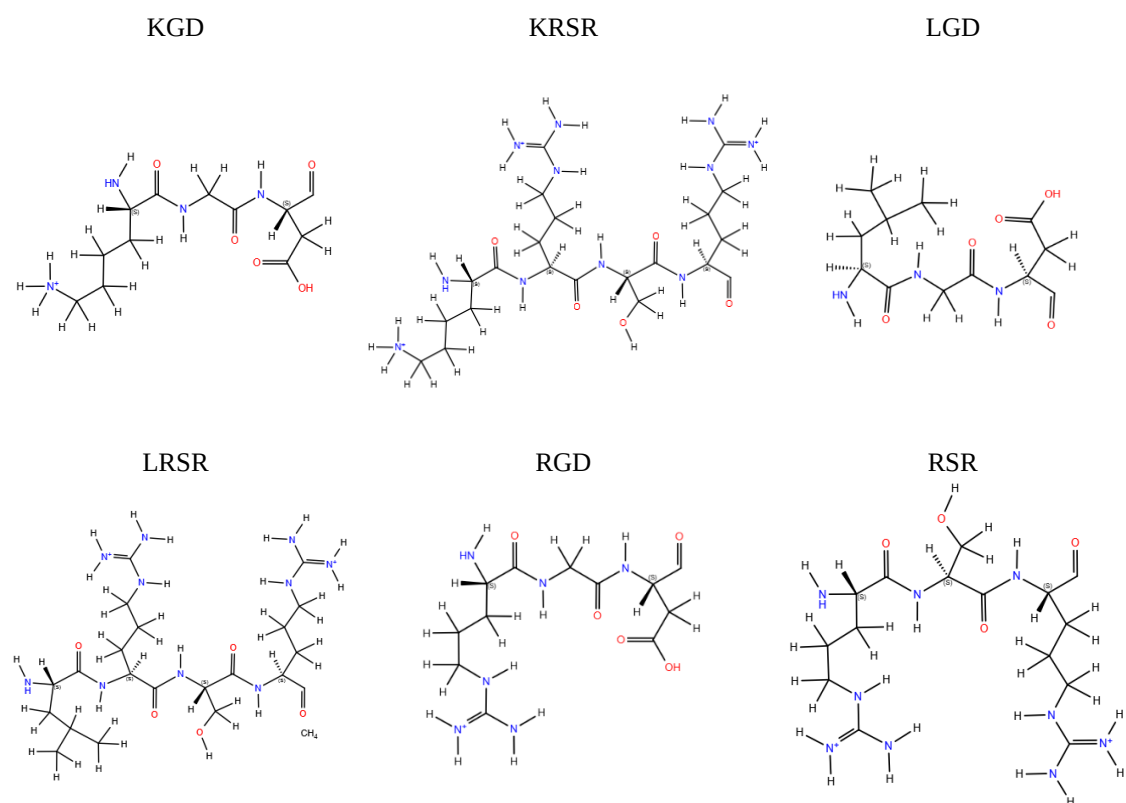
A 10. ábra mutatja az elkészített TiO_2 modelleket VMD 1.9.4 szoftverrel ábrázolva VDW reprezentációban ortografikus nézetben.



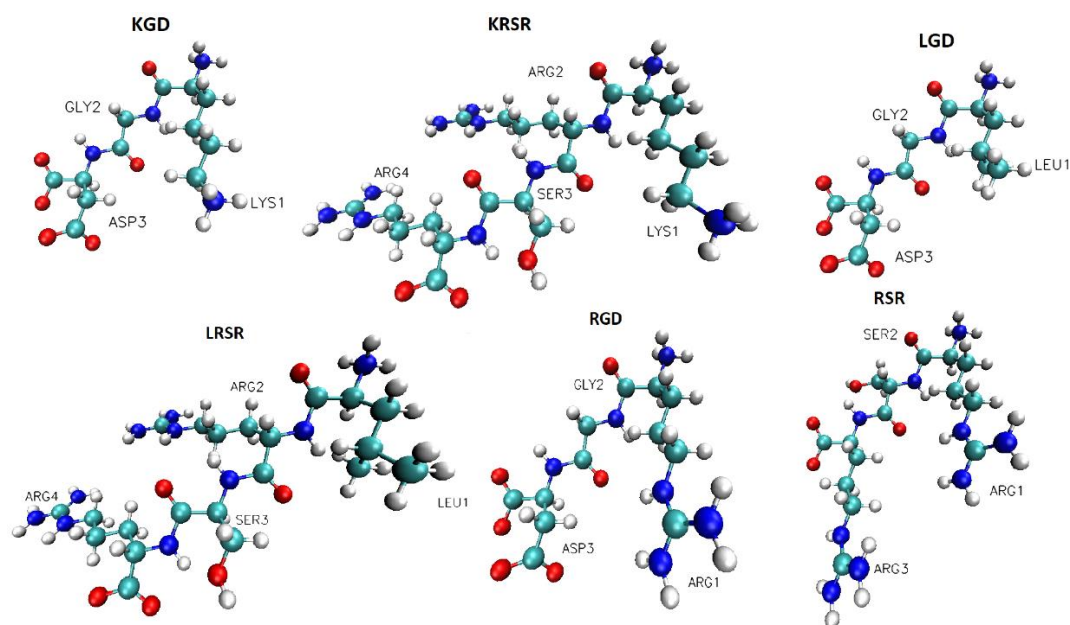
10. ábra: Az elemi cellákból elkészített TiO_2 kristály modell és az amorf TiO_2 modell. Az ábrát a VMD 1.9.4 szoftverrel készítettem. A piros szín jelöli az oxigén, a rózsaszín a titán atomokat.

A szimulációkhoz több peptid modellt készítettem a Gabedit 2.5.0 szoftver peptidszerkesztő moduljával [73]. Az irodalomban már alaposan tanulmányozott RGD (Arg-Gly-Asp) tripeptid mellett a MD módszerekkel még nem vizsgált KRSR (Lys-Arg-

Ser-Arg) tetrapeptidet szerkesztettem meg. Ezenfelül az RGD peptiden a töltött Arg részt lecseréltem Leu nem poláros aminosavra, így kaptam az LGD peptidet, valamint a szintén töltött Lys aminosavra, ez pedig a KGD tripeptid molekulát eredményezte. A KRSR esetén szintén kicseréltem az első töltött Lys aminosavrészt Leu-ra, ez eredményezte az LRSR peptidet, valamint az első aminosav részt levágva az RSR peptiden végeztem a későbbiek során szimulációkat. A 11. ábra mutatja az elkészített peptidek képletét, valamint a 12. ábra VMD-vel készített szokásos CPK reprezentációt [74].



11. ábra: A szimulációkhoz használt hat peptid képlete. Az ábrát a Schrödinger Maestro 2023-3 szoftverrel készítettem el.



12. ábra: Az elkészített peptid modellek CPK reprezentációban. Az ábrákat VMD 1.9.4 szoftverrel készítettem. Színjelölés: piros oxigén, kék nitrogén, cián szén, szürke hidrogén.

4.2 MD szimulációs protokollok

Az első három tézispontához kapcsolódó MD szimuláció során az anatáz kristályos TiO_2 felületre tapadó KRSR peptidet vizsgáltam. Az Olex2 szoftver segítségével készített anatáz modell felső felületének az (100) felületet állítottam be [72]. A teljes szimulációs tér egy $4,5 \text{ nm} \times 8,3 \text{ nm} \times 11 \text{ nm}$ méretű doboz. A z tengely a felületre merőleges tengely, ahol a KRSR peptidet elhelyeztem. Az anatáz TiO_2 $z = 0 \text{ nm}$ pozíciótól 4 nm magasságig tart és a kiindulási helyzetben felette helyezkedik el 2 nm-re a Gabedit 2.5.0-val megszerkesztett KRSR peptid [73]. A rendszerben a TIP3P (Transferable Intermolecular Potential 3-Point) vízmodellt használtam, amelyet az irodalomban széles körben használnak MD szimulációk során. Ez a vízmodell három pontból álló merev vízmolekulát ír le a megfelelő paraméterekkel (parciális töltések, Lennard-Jones paraméterek stb.) [75]. A feltöltés során 7625 vízmolekulát helyez el az algoritmus a rendszerbe. A szimulációs tér periodikus határfeltétellel rendelkezik (PBC, Periodic Boundary Condition), annak érdekében, hogy nagyobb felület szimulációját írja le a rendszer. Az ezutáni lépésben kicseréltem a GROMACS-ba beépített genion algoritmussal 13 vízmolekulát 5 Na^+ és 8 Cl^- ionra, ügyelve arra, hogy a teljes szimulációs tér töltése semleges legyen (ez 0,1% NaCl koncentrációt jelent a vizes fázisban). A

szimulációkhoz a CHARMM36 erőteret alkalmaztam, amely tartalmazta a KRSR peptid, a vízmolekulák és az ionok potenciál paramétereit, [76, 77]. A TiO_2 potenciál paraméterek esetében az előzőekben leírt módon, Luan és munkatársai által megadott értékeket használtam [55].

Ezt követően egyensúlyi állapotba hoztam az anatóz-KRSR rendszert, amely három lépésből állt: 1) energia-minimalizációs lépés (EM), 2) NVT (kanonikus sokaság, azaz konstans N részecskeszám, V térfogat és T hőmérséklet), valamint 3) egy NPT (izotermál-izobár sokaság, azaz konstans az N részecskeszám, P nyomás és T hőmérséklet). Az EM egy fontos iteratív lépés, amely szokásosan megelőzi az egyensúlyi állapot keresést és MD szimulációkat. Az egyes iterációk során az algoritmus meghatározza a potenciált és annak gradiensét, majd meghatározza ezen értékhez a részecske pozíció változását. Ezt követően, újra meghatározva a potenciális energiát a megváltozott koordináták szerint megvizsgálható, hogy konvergál-e az eredmény. Az EM lépés célja, hogy az adott molekuláris rendszer potenciális energiája minimum értéket vegyen fel. A rendszer összeállítása során a véletlenszerű elrendeződés következtében felvett túl közeli atomok és molekulák már a kiindulásnál akár ütköző pozícióban is lehetnek, ezáltal formálisan nagyon nagy potenciális energia értékek jelennének meg. Az EM algoritmus ezt a nem valós többlet potenciális energiát csökkenti a részecskék megfelelő elmozdításával. Az EM számításokhoz a széleskörben alkalmazott steep integrátort (steepest descent minimization) használtam. Az EM 2000 lépésből állt, majd ezt követte egy 500 ps hosszú NVT szimuláció és egy 100 ps hosszú NPT szimuláció $\Delta t = 1$ fs időlépésközzel. Ezen szimulációknál a hőmérsékletet 310 K-re állítottam be, az időkonstanst a V-rescale termosztát számára $\tau_T = 0,1$ ps-ra állítottam és az NPT-nél a nyomást $P = 1 \text{ bar}$ ($= 100 \text{ kPa}$)-ra és a Parrinello-Rahman barosztátot használtam $\tau_P = 2$ ps időkonstanssal. A szomszédos részecskékénél a maximális Coulomb és van der Waals levágási távolságot (cut off) 1 nm-re állítottam be. A program a MD számítások során e távolságot meghaladó szomszédoktól jövő járulékokat már nem vette figyelembe.

Az NVT, NPT és MD szimulációknál az előzőekben tárgyalt, a GROMACS- ba beépített bakugrás algoritmust alkalmaztam az időbeli integráláshoz. A teljes MD szimulációs idő hossza 200 ns volt, az időlépésközt $\Delta t = 2$ fs-ra állítottam. A 200 ns-os szimulációs idejű MD szimuláció utolsó állapotát további REMD szimulációra készítettem fel, amely a 2. és 3. tézispont eredményeihez kapcsolódik.

A negyedik és ötödik tézispontához tartozó MD szimulációk során szintén az AMCSD-n elérhető anatáz, rutil elemi cellákkal építettem fel a kristály szerkezeteket [70, 71], az amorf struktúrát az előzőekben tárgyalt módon készítettem elő. A megszerkesztett anatáz TiO_2 kristály struktúra mérete: $2,64 \text{ nm} \times 4,58 \text{ nm} \times 10,26 \text{ nm}$, a rutilé pedig: $2,11 \text{ nm} \times 4,89 \text{ nm} \times 10,67 \text{ nm}$ volt. A MD szimulációkat a Debrecen2 (Leo) GPU klaszteren futtattam a 2019.6 verziójú GROMACS-on. A Gabedit 2.5.0 programmal elkészített KGD, KRSR, LGD, LRSR, RGD és RSR peptideket ezután véletlenszerűen $\sim 2 \text{ nm}$ -re helyeztem el a TiO_2 felületektől.

A következő lépésben a három különböző szerkezetű TiO_2 felületre merőleges tengely mentén kibővítettem a rendszerek számára rendelkezésre álló teret 7 nm -rel. Az így nyert üres térrészben elhelyeztem az egyes peptideket. Az ezutáni lépésben történt a víz modellmolekulákkal (TIP3P) való feltöltés [75], ami átlagosan 11200 vízmolekulát eredményezett az anatáz felületen, 12800 -at a rutilon és 9800 -at az amorf TiO_2 -n. Az ezutáni lépésben a GENION algoritmus segítségével véletlenszerűen kicseréltem 10 db vízmolekulát (5 db Na^+ és 5 db Cl^- ion került a rendszerbe) ügyelve arra, hogy töltés semleges legyen a rendszerben. Tehát, ha valamelyik peptid töltéssel rendelkezik, akkor az ellentétes töltésű ionból annyiival több került a szimulációs térbe (KRSR esetén például további 3 Cl^- ion). A szimulációk során a CHARMM36 erőteret alkalmaztam és a fent említett TiO_2 potenciál paramétereit. Ezt követően egyensúlyi állapotba hoztam a rendszert, amely hasonlóan az előzőhöz, három lépésből állt: EM, NVT, valamint egy NPT szimulációból. Az EM maximum 4000 lépésből állt. Az EM algoritmus megállt, ha a kívánt legnagyobb erő értéket elérte a rendszer, amit $500 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{nm}}$ -nak határoztam meg. A van der Waals és Coulomb kölcsönhatás levágását 1 nm állítottam be. A következő lépés volt az egyensúlyi állapot megkeresése, amit két részre bontottam; egy $1,5 \text{ ns}$ hosszú NVT típusú MD szimulációra és egy $0,5 \text{ ns}$ NPT típusúra. A peptideket alkotó láncra egy további harmonikus kényszert írtam elő az egyensúlyi állapot keresése során, mely $D = 1000 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{nm}^2}$ rugó állandóval volt jellemezhető. Erre azért volt szükség, hogy a peptid a kezdeti pozíciótól ne mozduljon el az egyensúlyi állapot keresési szimulációk során. Mind az NVT és NPT során az időlépésköz $\Delta t = 2 \text{ fs}$ volt, a numerikus integrálás a bakugrás algoritmussal történt és a hőmérséklet pedig $T = 310 \text{ K}$ volt. Az NVT során V-rescale termosztátot használtam, amely során a vízmolekulák alkottak egy csoportot és

a felületet alkotó TiO_2 atomok, valamint a peptidek külön még egyet. A termosztátnál alkalmazott időkonstanst $\tau_T = 0,1$ ps-nak választottam. Az NPT egyensúlyi állapot kereső szimulációnál a nyomást $P = 1 \text{ bar}$ ($= 100 \text{ kPa}$), a Parrinello-Rahman barosztát időállandót $\tau_P = 2$ ps-nak határoztam meg. Továbbá az NVT és NPT szimulációknál mind a három irányba beállításra került a periodikus határfeltétel. Az így kapott egyensúlyi állapotban rengeteg vízmolekula tapadt meg a TiO_2 felületen. A vizes fázisba ezért újabb TIP3P vízmolekula feltöltést végeztem, ami átlagosan 2360 vízmolekulát helyezett el a szimulációs térben, majd újra átesett az előbb említett három egyensúlyi állapot beállítás lépéseken a rendszer (EM, 1,5 ns NVT és 0,5 ns NPT).

A második MD szimuláció sorozat esetén az időlépésközt továbbra is $\Delta t = 2$ fs-nak választottam meg és a teljes szimuláció $n = 250\,000\,000$ lépésből állt, azaz a teljes szimulációs időtartam $t = 500$ ns volt. Az időbeli numerikus integrálás szintén a bakugrás algoritmussal történt.

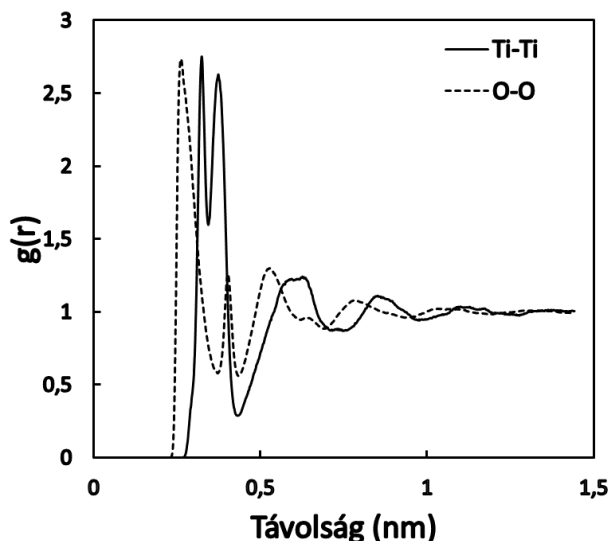
4.3 MD trajektória eredmények elemzése

A MD eredmények elemzésekhez számos, az irodalomban jól bevált módszert alkalmaztam, úgy, mint RMSD (Root Mean Square Deviation) meghatározása vagy az RDF (Radial Distribution Function) kiszámítása. Az RMSD a referencia atomi koordinátákhoz képest a vizsgált molekula atomi koordinátáinak az eltérését jelenti. A referencia állapot általában az egyensúlyi állapotban megtalált molekula állapot szokott lenni vagy a röntgen diffrakciós mérések során kapott struktúra. Az RMSD az egyik leggyakrabban használt mennyiség a MD elemzések során; információt szolgáltat arról, hogy a rendszerben kijelölt molekula vagy molekula részek mennyire változnak az idő függvényében a MD szimuláció során. Az RMSD értéket tömegsúlyozott esetben a következő formulával lehet meghatározni:

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i (\mathbf{r}_i(t_1) - \mathbf{r}_i(t_2))^2 \right]^{1/2}, \quad (24)$$

ahol $M = \sum_{i=1}^N m_i$ a molekula össztömege, $\mathbf{r}_i(t_1)$ és $\mathbf{r}_i(t_2)$ a molekula i -edik atomjának koordinátája a t_1 -edik és t_2 -edik időpillanatokban. Az RMSD meghatározásakor legkisebb négyzetes illesztést szokás végezni a molekula különböző időpontbeli szerkezetei között, így kiküszöböljük a molekula teljes translációját és a rotációját, olyan mennyiséget kapunk, ami csak a molekula alakjának változását írja le.

Az RDF számolás megadja a vizsgált részecskék közötti távolságok $g(r)$ eloszlását a MD szimuláció során. Kristályos és amorf szerkezet vizsgálatkor különösen hasznos, hiszen megadja, hogy milyen karakterisztikus távolságokra vannak egymástól az egyes atomok.



13. ábra: Az elkészített amorf TiO_2 szerkezet atomjainak (RDF) radiális eloszlása a távolság függvényében.

A 13. ábra mutatja az elkészített amorf szerkezetet alkotó oxigén-oxigén atomok és titán-titán atomok távolságának eloszlását. Az eloszlásokban látható maximumok jól egybeesnek Luan és munkatársai által készített amorf TiO_2 nanorészecske radiális eloszlásával [55]. Továbbá a kutatás során elemeztem a peptidek TiO_2 felületektől vett távolságát; megvizsgáltam, hogy a felülethez köthető legközelebbi atom távolsága hogyan változik az idő függvényében.

4.4 REMD szimuláció protokoll

A replika kicserélési molekula szimulációk (Replica Exchange Molecular Dynamics, REMD) során több MD szimuláció fut párhuzamosan különböző hőmérsékleten [46]. A különböző hőmérsékletű MD szimulációkat replikáknak nevezik és bizonyos időközönként a kijelölt részek (molekulák vagy térrészek stb.) kicserélődhetnek a szomszédos replikák között. Az i -edik és j -edik replika közötti csere P valószínűsége a következő Boltzmann eloszlás kifejezéssel határozható meg:

$$P(i \leftrightarrow j) = \min \left(1, \exp \left[\left(\frac{1}{k_B T_i} - \frac{1}{k_B T_j} \right) [U_i - U_j] \right] \right), \quad (25)$$

ahol $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23} \frac{J}{K}$ a Boltzmann-állandó, T_i és T_j az i -edik és j -edik szimulációs replika hőmérséklete. Az U_i és U_j a kicserélendő i -edik és j -edik replikában a kijelölt részek potenciális energiája. A csere segítségével feltérképezhetők azok a különböző molekulaállapotok, amelyek egyetlen hőmérsékleten történő szimulációval nem lettek volna elérhetőek, vagy csak nagyon hosszú szimuláció során került volna a molekula ezen állapotokba. A hőmérséklet különbség megválasztása az egyes szimulációk között fontos lépés, hiszen, ha túl nagy a hőmérséklet különbség, akkor a (25) egyenlet alapján a csere valószínűsége 0-hoz tart. A REMD szimulációk során a csere valószínűséget érdemes 20-50%-ra beállítani. Az én REMD szimulációimnál $\Delta T = 1,5$ K hőmérséklet különbséget állítottam be a szomszédos replikák között. A KRSR molekula csere valószínűsége átlagosan 30%-ra adódott. Fontos kiemelni, hogy ez a vizsgált rendszertől is függ, hiszen a potenciális energiák jelentősen eltérhetnek nagyon különböző rendszerek esetén. Összesen 96 különböző szálon futott a REMD szimuláció, a legalacsonyabb hőmérséklet 310 K-re állítottam be, így a legmagasabb hőmérséklet 452,5 K-nek adódott. A REMD szimulációt egy rövid felfűtési (annealing) 1,25 ns NPT szimuláció előzte meg. Az egyes REMD szimulációk időhossza 50 ns volt. Az időlépésközt továbbra is 2 fs-nak állítottam be és a csere minden 500-ik lépésnél, azaz 1 ps-onként történhetett meg. A REMD szimulációk esetén általában a legalacsonyabb hőmérsékleti replika kerül elemzésre, mivel a legalacsonyabb potenciális energiával rendelkező állapotok erre a szimulációs szála kerülnek a cseréknek köszönhetően. Ezen a szimulációs szálon végeztem én is elemzéseket. Megvizsgáltam, hogy milyen különböző molekula konformációs sokaság fordul elő a „linkage” klaszterezési módszerrel. A módszer lényege, hogy a különböző molekula konformációkat az RMSD alapján választja szét, azaz, ha a KRSR molekulát alkotó atomok koordinátaiban egy bizonyos érték feletti eltérés adódik, akkor külön molekula konformációs klaszterként kezeli. Ezek alapján én a klaszterezésnél a szokásos 0,1 nm RMSD levágását alkalmaztam a konformációk elkülönítésére.

4.5 Elhúzás szimuláció protokollok

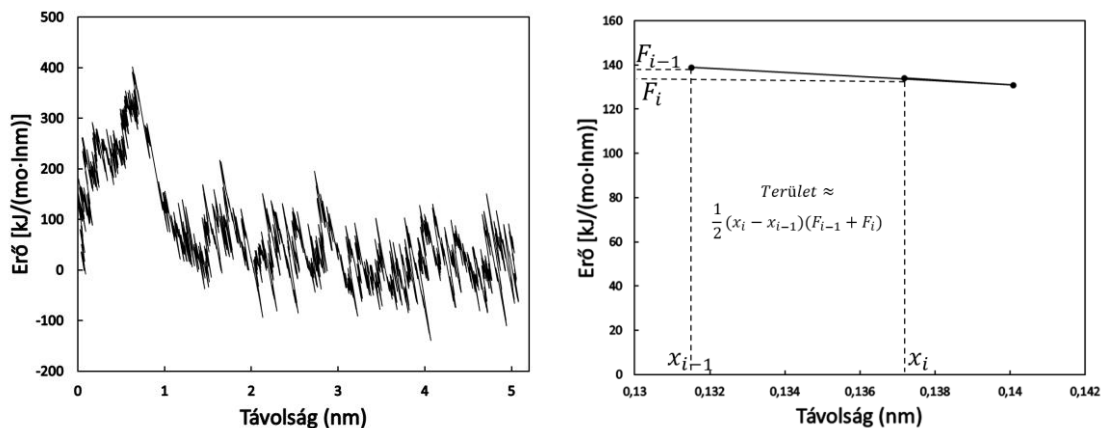
A harmadik és ötödik tézispontához tartozó vizsgálataim során elhúzás (pull) MD szimulációkat hajtottam végre. Az előbbinél a REMD szimulációkkal feltérképezett domináns KRSR molekula klaszter reprezentánssal végeztem elhúzási szimulációt. Az elhúzást az anatóz TiO_2 felületre merőleges tengely mentén végeztem, ebben az esetben ez volt a z tengely. A szimulációs teret kibővítettem a z tengely mentén 18 nm-re, hogy a molekulát a felülettől el lehessen húzni pár nm-re. Mivel a szimulációs tér kibővült, ezért egy új 200 ps NPT egyensúlyi MD szimulációt végeztem az elhúzás előtt. Az elhúzás során a KRSR molekula tömegközéppontjára egy $D = 1000 \frac{\text{kJ}}{\text{mol nm}^2}$ rugóállandóval jellemezhető (umbrella típusú) harmonikus potenciált alkalmaztam, az elhúzás sebességét 5 nm/ns-nak választottam. Az elhúzási szimuláció hossza 1 ns volt 2 fs időlépésközzel, a Coulomb és van der Waals levágási távolságot pedig 1,4 nm-re állítottam be.

Az ötödik tézispontához kapcsolódó elhúzás szimulációk során hat különböző peptidet a háromfajta TiO_2 felülettől húztam el. A 18 darab MD számolás egyenként 500 ns-os szimulációs időtartományából azokhoz az időpontokhoz tartozó peptid állapotokat használtam kiindulási állapotként, amikor az adott peptid a felülethez a legközelebb került. Ezen peptid pozíciók mintegy 1 atom távolságra ($\sim 0,13$ nm-től 0,22-ig) voltak a TiO_2 felületektől. Az elhúzási szimulációt egy 500 ps NPT egyensúlyi szimuláció előzte meg, ahol a peptidláncokat alkotó atomokra egy $1000 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{nm}^2}$ rugóállandóval jellemezhető harmonikus kényszert írtam elő, hogy a helyükön maradjanak. Az elhúzás sebességét 10 nm/ns-re állítottam be, valamint a Coulomb és van der Waals levágási távolságot ebben az esetben is 1,4 nm-nek határoztam meg. Az ötödik tézispont legfontosabb eredményét az elhúzás során kapott erő-távolság grafikonok elemzésével kaptam. Numerikus módszerrel kiszámoltam a görbe alatti területet azon pontig, ahol a felület és a peptid között kölcsönhatás megszűnt. A (26) egyenletben megadott húrtrapéz formulával közelítettem a területet:

$$\int_0^L f(x) dx \approx \frac{1}{2} \sum_{i=2}^N (x_i - x_{i-1}) (F_i + F_{i-1}), \quad (26)$$

ahol L a felület-peptid kölcsönhatás távolsága (ez például $\sim 1,5$ nm a 14. ábrán), x_i jelöli a felvett távolság értékeket, F_i pedig az ezekhez tartozó erő értékeket, amelyekből N darab

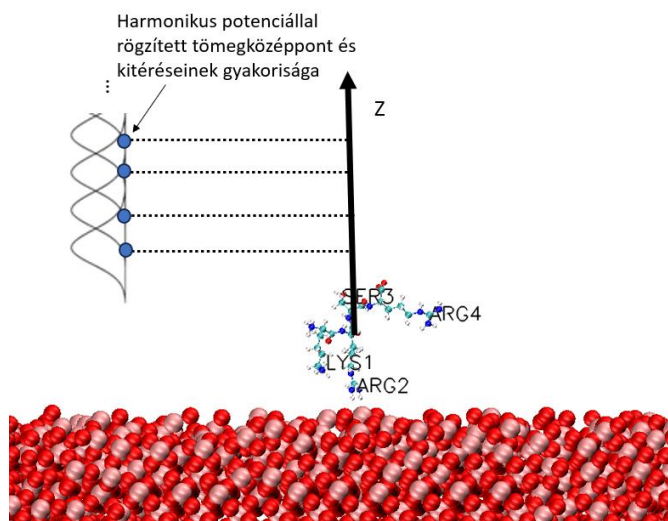
van. A 14. ábra példaként egy felvett erő-távolság görbét mutat, a jobb oldali diagram pedig a bal oldali ábráról 3 felvett értéket mutat egy szűk távolság tartományban.



14. ábra: Példa az erő-távolság görbére (bal oldali grafikon), illetve ennek egy részlete (jobb oldali grafikon), melyen 3 érték látható az alkalmazott trapéz terület közelítés formulájával.

4.6 Umbrella sampling és PMF

A harmadik tézisponthoz tartozó vizsgálatok során umbrella samplinget hajtottam végre, amely egy speciális MD mintavételezési technika, ami a rendszer különböző állapotai között a szabadentalpia különbségeket tudja megbecsülni. Ehhez az anatóz TiO_2 felülettől elhúzott KRSR molekula trajektóriát elemeztem. Kijelöltem 24, egymástól egységes távolságra lévő pontot, amelyekhez tartozó állapotokat az umbrella sampling MD szimulációk kiindulási állapotainak tekintettem. A KRSR-felület legközelebbi atomjainak távolsága 0,156 nm volt az első mintavételezés során, a legtávolabbi esetben pedig 2,77 nm. A 15. ábra szemlélteti a harmonikus potenciállal különböző pontokban rögzített KRSR molekula tömegközéppont pozícióit és a MD szimulációkból kapott hely szerinti eloszlásait.



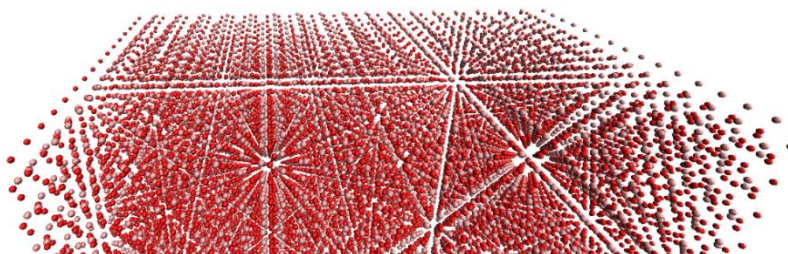
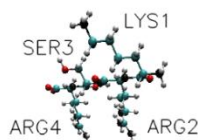
15. ábra: Az umbrella sampling során különböző pontokban rögzítettem egy harmonikus potenciállal a KRSR molekula tömegközéppontját, majd az így elvégzett MD szimulációk során a kitérések eloszlását elemeztem.

Az így kapott molekula tömegközéppont pozíció kitérések az idő folyamán egy normális eloszlást követnek. A tömegközéppontot egy $D = 1000 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{nm}^2}$ rugóállandóval jellemezhető harmonikus potenciál tartotta az egyes pozíciókban. A mintavételezést egy 1,2 ns NPT egyensúlyi állapot keresés szimuláció előzte meg mind a 24 pozícióban. Az egyes pontokban 10 ns MD szimulációt végeztem 2 fs időlépésközzel. Az eredményeket a GROMACS-ba beépített WHAM algoritmus segítségével elemeztem [78]. A WHAM (Weighted Histogram Analysis Method) segítségével a molekulára ható eredő erők átlagaihoz meghatározhatjuk a potenciális energia értéket (PMF, Potential of Mean Force). Jelen esetben azt az átlagos erőt határozza meg a WHAM, ami a KRSR molekula tömegközéppontjára hat az egyes pontokban az umbrella sampling során, és ezekhez számol potenciál értékeket. A kapott PMF értékek a különböző pozíciókban egy görbét rajzolnak ki, és e görbe alapján számolható ki a ΔG kötési szabadentalpia.

5 Eredmények és diszkusszió

5.1 A KRSR molekula - anatóz TiO_2 felület kölcsönhatásának MD szimulációja

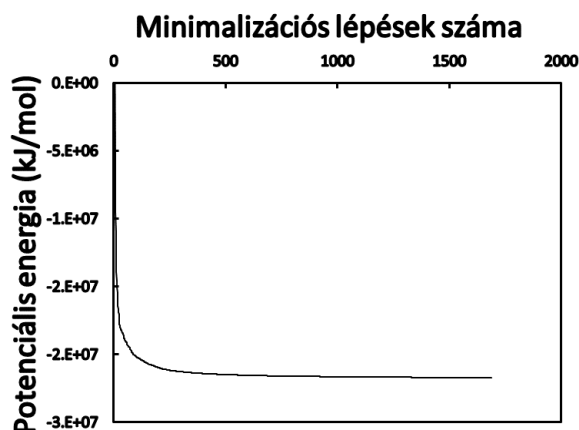
Anatóz (100) felületre a négy aminosavból álló KRSR molekula adszorpcióját modelleztem vizes környezetben MD szimulációk elvégzésével. A létrehozott anatóz modell mérete $4,5 \text{ nm} \times 8,3 \text{ nm} \times 4 \text{ nm}$, 17820 Ti és O atomot tartalmazott 1:2 arányban. A vizes fázis a TiO_2 felület felett helyezkedett el. A teljes szimulációs doboz mérete $4,5 \text{ nm} \times 8,3 \text{ nm} \times 11 \text{ nm}$, összesen 7625 vízmolekulát tartalmazott, valamint véletlenszerűen elhelyezve 5 Na^+ és 8 Cl^- iont. A KRSR molekula háromszorosan töltött pozitívan, ezért több Cl iont helyeztem el, hogy semleges töltésű legyen a teljes rendszer. A kezdeti állapotot tekintve a KRSR tetrapeptid a felülettől kezdetben mintegy 2 nm-re helyezkedett el, amelyet a 16. ábra mutat.



16. ábra: A titán-dioxid felület és a KRSR peptid kezdeti állapota, vízmolekulák ábrázolása nélkül. Az ábra, ami a VMD 1.9.4 program segítségével készült, az atomokat CPK reprezentációban mutatja.

A kezdeti geometriának megfelelő rendszer – amelyben az atomok elhelyezkedése még nem került egyensúlyi állapotba – egy 2000 lépéses energia-minimalizációs eljárásen esett át először. Ez az eljárás a teljes rendszerre számolt potenciális energiát mintegy 1500 lépésben csökkentette a kezdeti potenciális energia értékről mintegy $-2,2 \cdot 10^7 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ értékre. A rendszer potenciális energiájának változását a 17. ábra szemlélteti,

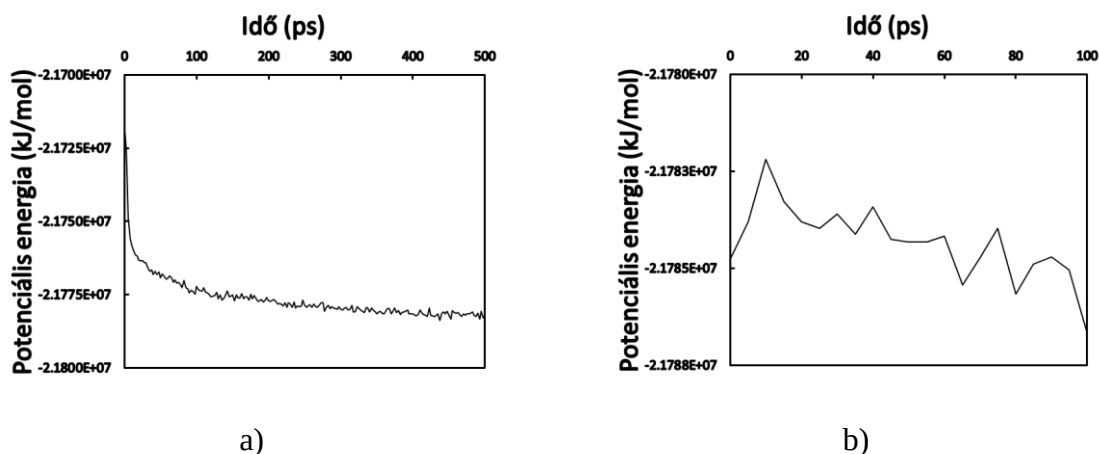
amely egy szokásos exponenciális csökkenést mutat a lépések számának függvényében [44, 46].



17. ábra: Az anatóz-KRSR rendszer potenciális energiája a minimalizációs eljárás során a lépések számának függvényében.

A MD szimulációt megelőző egyensúlyi állapot keresés egy 500 ps hosszú NVT és egy 100 ps hosszú NPT szimulációból tevődött össze 1 fs időlépésközzel, a hőmérsékletet pedig $T = 310$ K-re állítottam be. Ezeknél a szimulációknál a V-rescale termosztát módszert alkalmaztam (időlépés $\tau_T = 0,1$ ps, lásd (20) egyenlet), továbbá az NPT-nél Parrinello-Rahman barosztátot $P = 1$ bar nyomáson (az időlépés $\tau_p = 2$ ps, lásd (22) egyenlet). A Coulomb és van der Waals levágás paramétereiket 1 nm-re állítottam be.

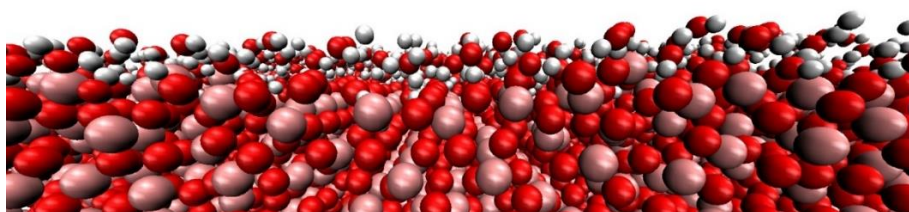
Az egyensúlyi állapot keresési szimulációkban a periodikus határfeltételt (PBC) is beállítottam. A 18. ábra mutatja a teljes rendszer potenciális energiáját az idő függvényében az NVT és NPT szimulációk során.



18. ábra: A teljes rendszer potenciális energiájának változása az idő függvényében az NVT (a) és NPT (b) szimulációk esetén.

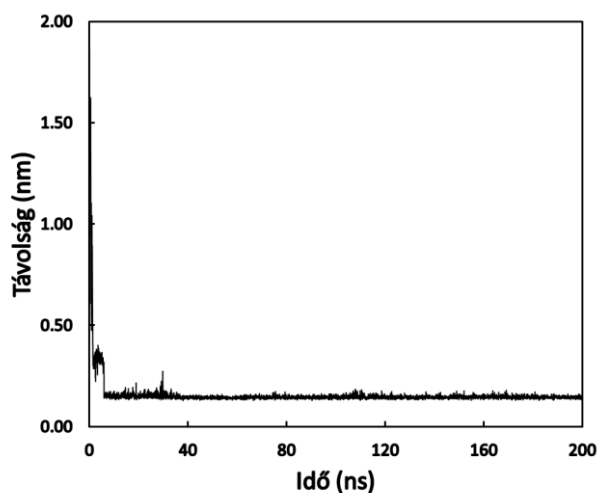
Jól megfigyelhető, hogy az NPT szimulációs ideje alatt már igen kis mértékű a változás, azaz a modellrendszer készen áll a MD szimulációra.

Az ezt követő MD szimuláció által követett teljes időhosszt 200 ns-nak választottam. Ez az idő skála már relevánsnak számít a peptid molekula állapotainak megfigyeléséhez egy felületen. Egy ekkora rendszer ilyen időhossz szimulációja már igen nagy számítási kapacitást igényel, ezért ezt a Debrecen2 (Leo) szuperszámítógépen végeztem el. Ez a 200 ns-os időtartomány bőségesen elegendő volt a felülettel való adszorpció kialakulásához egy ilyen molekula esetén. Megfigyeltem, hogy a vízmolekulák a felületen már az első időpillanatokban (<1 ps) megtapadtak és beborították azt. A 19. ábra mutatja a MD szimuláció elején kiragadott pillanatképet, a felületre tapadt első vízmolekula réteget és a TiO_2 felület atomjait.



19. ábra: A TiO_2 felületet borító vízmolekulák a MD szimuláció első idő pillanataiban már megtapadnak. Az atomok szinkódolása: oxigén - vörös, hidrogén - fehér, titán - rózsaszín.

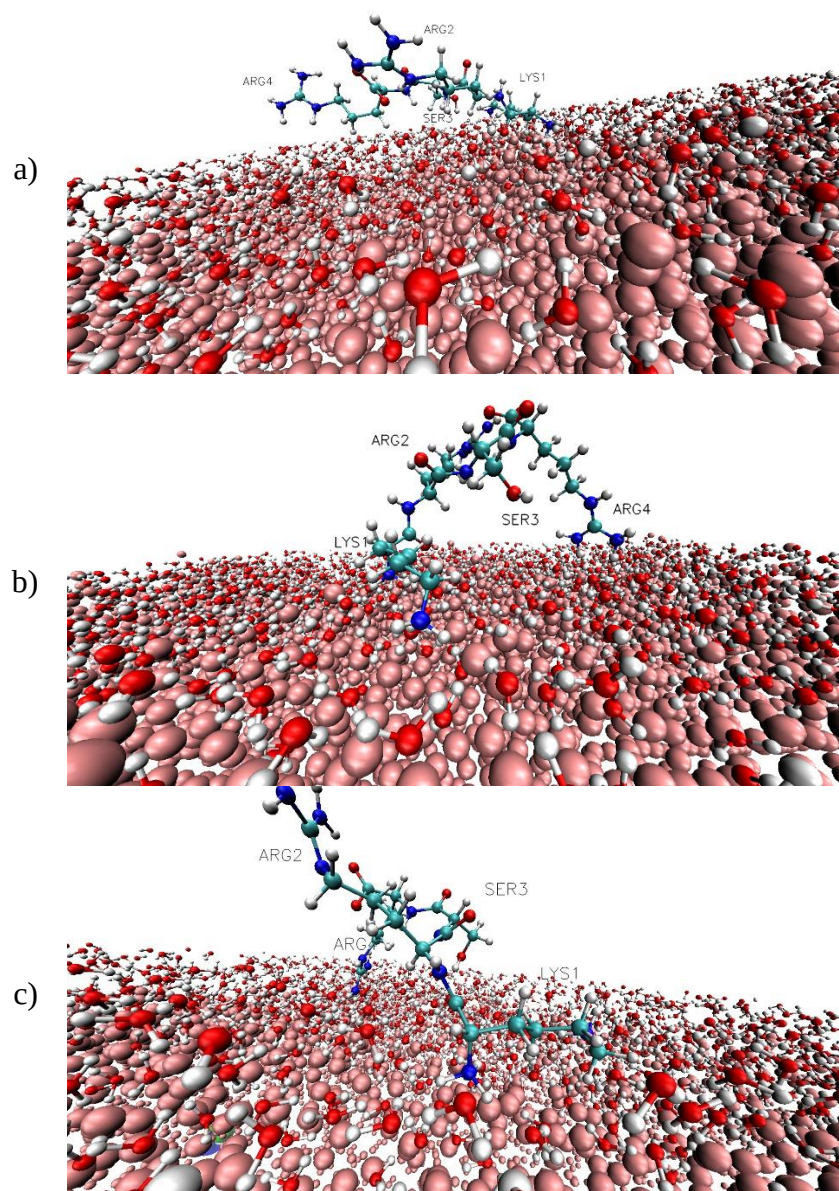
A 20. ábra az anatóz TiO_2 felület és a KRSR peptid legközelebbi atomjainak távolságát mutatja az idő függvényében.



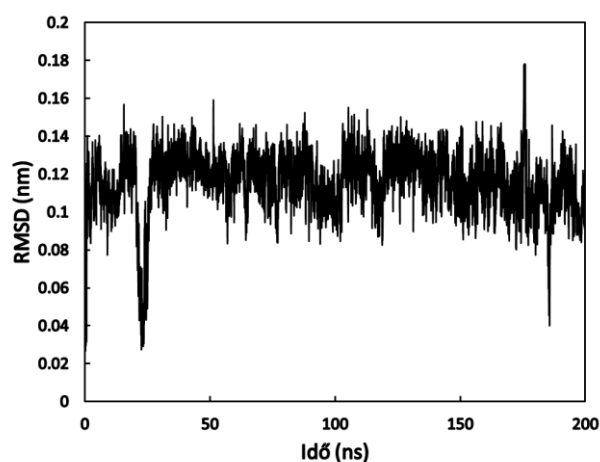
20. ábra: A KRSR peptid és az anatóz TiO_2 legközelebbi atomjainak távolsága az idő függvényében.

A 20. ábra alapján az adszorpciós folyamatot három fázisra osztottam fel. Az első fázisban a vizes környezetből indulva a felülethez közeledik a molekula, amelyet az első 1,5 ns alatt $\sim 0,3$ nm-re közelít meg. A következő fázisban a peptid megtapad és tartja a $\sim 0,3$ nm távolságot. Ekkor a peptid a vízmolekulákkal borított felületen tapad meg. Ez a második fázis ~ 6 ns-nál ér véget. A 6 ns utáni időtartományban, a harmadik fázisban pedig stabilan rögzül, közvetlenül a felülettel hat kölcsön, a vízmolekulák közé beékelődve. Ekkor a távolság lecsökken már a szoros kötési távolságra, $\sim 0,15$ nm-re. A szimulációs idő hátralévő részében (mintegy 194 ns) pedig ezt a távolságot tartja végig, onnan nem szakad el.

A 21. ábra az első vízmolekula réteggel fedett TiO_2 felületről és a KRSR molekuláról három különböző pillanatképet mutat. A VMD molekula trajektória megjelenítő szoftver segítségével a KRSR molekulát a kép középpontba trajektória konvertálással helyeztem el, amely a környező atomok koordinátáit ehhez képest módosította. A 21. ábra mutatja, hogy jellegzetesen a KRSR töltött részei hatnak kölcsön az anatóz TiO_2 felülettel. A KRSR az első N-terminális, azaz a Lys töltéssel rendelkező aminosav aminocsoportjával tapad meg. A molekula több adszorpciós állapota is megfigyelhető. Az a) ábrán mintegy elterül a felületen a KRSR molekula, főleg a Lys része hat kölcsön a felülettel a vízzel borított rétegen keresztül. A b) ábrán egy hídszerű állapot figyelhető meg, ahol az első és utolsó töltött aminosav részek (Lys és Arg) hatnak kölcsön a felülettel, a c) ábrán pedig már közvetlenül a felülettel hat kölcsön a Lys rész, a vízmolekulák közé beékelődve. A molekula atomjainak változását jellemzi az RMSD mennyiség, amelynek időbeli lefutását a 22. ábra mutatja. Az RMSD az egyes atomok átlagos négyzetes változásának összegének a négyzetgyöke. Az RMSD érték megváltozása a molekula alakban változást jelenthet, mivel a molekulát alkotó atomok pozíciói megváltoznak egymáshoz képest. Az RMSD referencia pontja a szimuláció kezdetén lévő molekula geometria, azaz a későbbi időpillanatokban ehhez képest nézi az algoritmus az atomi koordinátáknak változását. A teljes KRSR molekula RMSD értéke $\sim 0,12$ nm körül ingadozik az egész szimulációs idő alatt, melynek felfutása az első 1 ns szimulációs idő során megtörténik. Az 1 ns utáni időpillanatokban az ábra alapján az atomi koordináták már nem változnak jelentősen. A legnagyobb RMSD változást közvetlenül a szimulációs idő elején láthatjuk, majd szinte ezt a szintet tartja végig a molekula.



21. ábra: Pillanatfelvétel a megkötött KRSR molekuláról és a vízmolekulákkal borított TiO_2 rétegről. Az a) ábrán $t=1,48$ ns (megkötődés pillanata), a b) ábrán $t=5,88$ ns, a c) ábrán $t=130$ ns. Színjelölés: A TiO_2 Ti és O atomjait rózsaszínnel jelöltem. A víz és a peptid atomjainak színjelölése: hidrogén - fehér, oxigén - piros, nitrogén - sötétkék és a szén - ciánkék.



22. ábra: A KRSR peptid atomjainak változását leíró RMSD az idő függvényében.

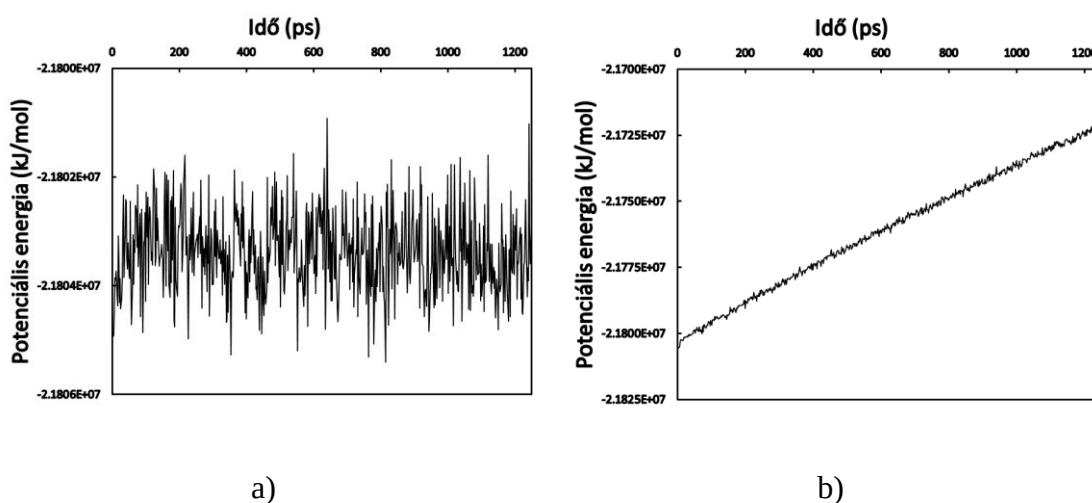
A KRSR molekulára vonatkozó RMSD értékek átlaga a kezdeti geometriához képest 0,116 nm, a szórás pedig 0,016 nm. Ez az átlagos RMSD viszonylag kis változásra utal; a molekula geometriája nem változik sokat az egyensúlyi állapot megkeresése utáni MD szimuláció során. A lehetséges molekula-konformációk feltérképezéshez további módszereket alkalmaztam, melyeket a következő alfejezetben részletezek.

A KRSR molekula tehát stabilan megtapadt az anatáz TiO_2 felületen és ahogy azt a 21. ábra is mutatja számos molekula állapot megvalósult a 200 ns alatt. Maga az adhézió a töltéssel rendelkező csoportokon valósul meg (N-terminális aminocsoportja, C-terminális karboxilcsoportja), ezek hatnak kölcsön a felülettel. Wu és munkatársai megvizsgálták az RGD (110) rutil TiO_2 felületen való tapadását különböző vízmodellekkel (TIP3P, SPC/E) [66]. Ők is azt találták, hogy a felületet alkotó oxigén atomok jellegzetesen az RGD aminocsoportjaival (NH_3^+ , NH_2^+ és NH_2) alakítanak ki hidrogén-híd kötést. Eredményeik alapján maga a vízmodell megválasztása nem befolyásolta jelentősen a felületre tapadó RGD molekula tapadásának módját, azonban a molekula konformáció stabilitásában lehet szerepe. A korábban említett Zhang és munkatársai által készített kutatásban szintén elemezték az RGD tapadását MD módszerekkel a vizes környezet figyelembevételével különböző kristálysíku felületeken: rutilon (110, 100, 001, 010) és anatázon (101, 100, 001, 010) [62]. Eredményeik szintén megerősítették, hogy az RGD peptid a felületen hidrogén-híd kötéssel tapad meg. Azt is megfigyelték, hogy az egyes molekula részek különböző szerepeket töltenek be az adszorpció során. A MD szimulációs eredményeik alapján az adhézió szempontjából a legígéretesebb felületek az anatáz esetében a (001), a rutil esetében a (010) kristálysíkok

voltak. Az RGD konformációs változását leginkább a molekulalánc közepén található torzióknak tulajdonították. A megtapadt molekula vég kevésbé változott, amit én is megfigyeltem a KRSR adhéziója során.

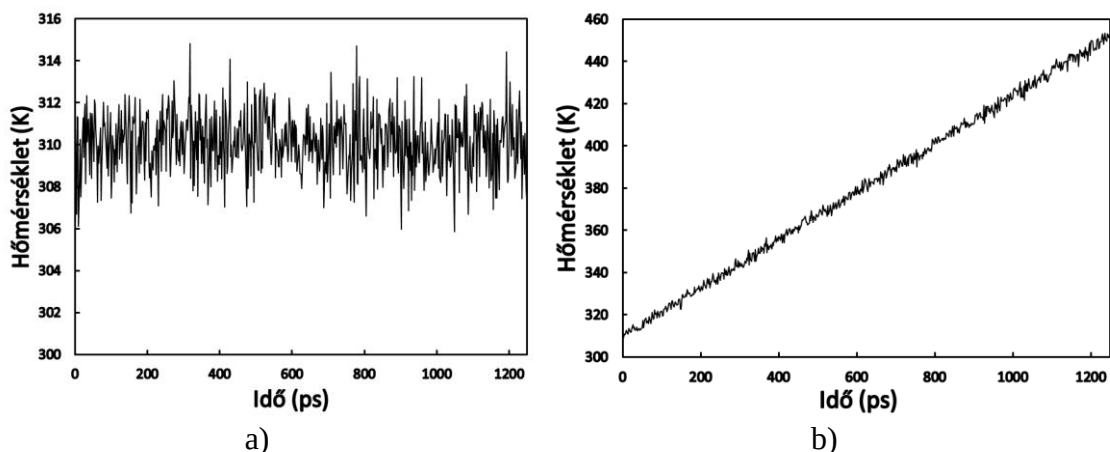
5.2 Az anatózhoz kötött KRSR molekula konformációnak feltérképezése REMD szimulációval

A domináns KRSR molekula konformációk megállapításához a REMD módszert alkalmaztam, amely 96 szálal, 310 K-tól 454 K-ig különböző hőmérsékletű 50 ns szimulációs idejű párhuzamos lefutású szimulációból állt. A REMD számára a bemeneti atomi koordináták a 200 ns időtartamot modellező szimuláció utolsó időpillanatából származtak. A REMD során az egyes szimulációs szálak között 1,5 K hőmérséklet különbséget állítottam be. Ezzel a beállítással a rendszeremnél így minden 500. időlépésnél (pontosan 1 ps-onként) ~30% volt a KRSR molekula csere valószínűsége az egyes szimulációs szálak között. Mivel a hőmérséklet a 96 szimulációs szálon (replikán) eltérő, ezért egy újabb egyensúlyi állapot keresés előzte meg a REMD-et minden egyes replikán, amely egy 1,25 ns felfűtési szakaszból állt, 2 fs időlépésközzel. A rendszer felfűtések során számolt potenciális energiája az idő függvényében a 23. ábrán látható a legalacsonyabb és a legmagasabb hőmérsékletű replika esetében. Nyilvánvaló, hogy a legalacsonyabb hőmérsékletű replika esetében a hőmérséklet nem változik, tehát csak egy kis mértékű potenciális energia ingadozás figyelhető meg (23. ábra a) része).



23. ábra: A REMD szimulációkat megelőző felfűtés során az anatóz-KRSR rendszer potenciális energiája az idő függvényében; a) a legkisebb $T=310$ K hőmérsékletű replika, b) $T=452,5$ K hőmérsékletű replika.

A 23. ábra b) részén a rendszer potenciális energiája folyamatosan növekszik a hőmérséklet növekedésének megfelelően.

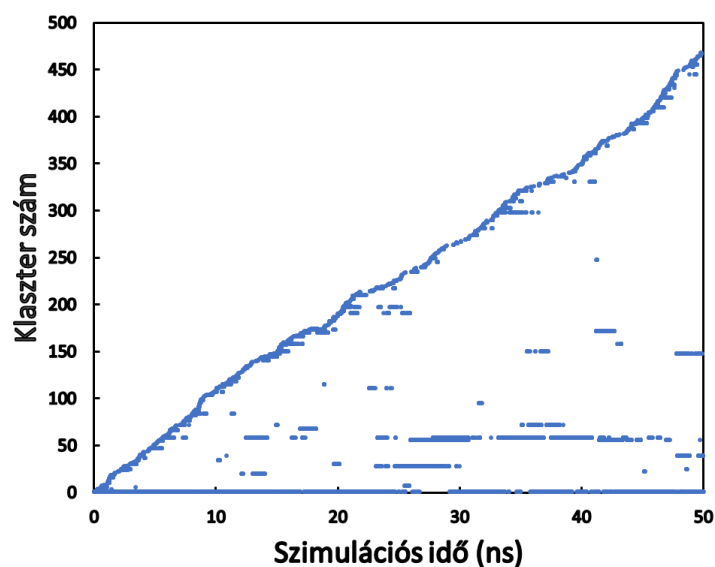


24. ábra: A REMD szimulációkat megelőző felfűtés során az anatóz-KRSR rendszer hőmérséklete az idő függvényében; a) a legkisebb, $T=310$ K hőmérsékletű replika, b) $T=452,5$ K hőmérsékletű replika.

A 24. ábra azt mutatja, hogy a legkisebb hőmérsékletű replikán, a hőmérséklet a beállított 310 K érték körül oszcillál, a b) részen pedig a fokozatos hőmérséklet emelkedés látható, rajta kis oszcillációkkal.

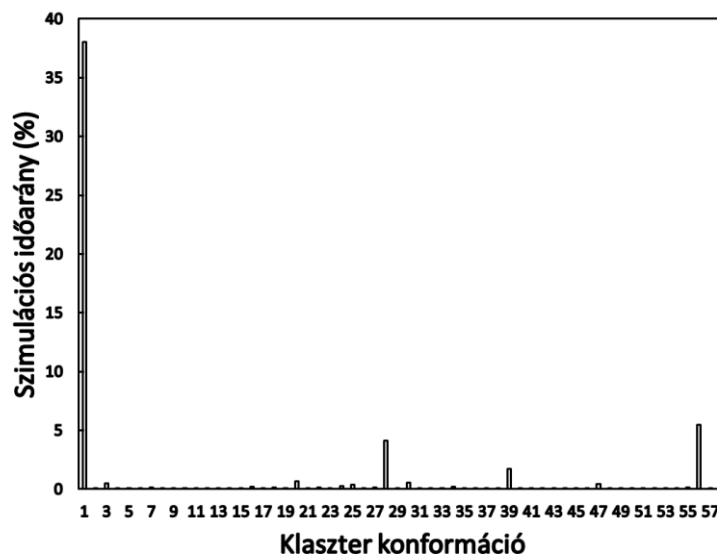
A molekula klaszterezési analízist a legalacsonyabb hőmérsékletű szimulációs szálon végeztem el, mivel a legalacsonyabb potenciális energiával rendelkező állapotok erre a replikára kerültek. A különböző konformációk feltérképezéséhez linkage clustering módszert alkalmaztam, ahol az RMSD levágás (cut-off) 0,1 nm-re került beállításra. Ez azt jelenti, hogy egy adott klaszterben található bármely molekulaállapot kevesebb, mint 0,1 nm RMSD értékben tér el a klaszterben található valamelyik állapottól. Összesen 468 klasztert eredményezett az analízis, továbbá 4539 klaszter konformáció-átmenet történt ezek között. A klaszter méret definíció szerint azt jelenti, hogy a szimuláció során a molekula hány alkalommal kerül be az adott klasztert jellemző konformációs állapothoz közeli állapotba, e kevéssé eltérő molekula állapotok száma adja meg a klaszter méretet.

Az egyes konformációk közötti átmeneteket mutatja a 25. ábra, melyen az látható, hogy az idő előrehaladtával újabb konformációk jelennek meg, de a legelső 1-es klaszter (a 25. ábrán az x tengelyen lévő, néha szaggatott kék vonal jelzi) és még néhány további klaszter konformációhoz többször visszatér a molekula a REMD szimulációs idejének egy részében.



25. ábra: Az egyes klaszterátmenetek a szimulációs idő függvényében.

A négy domináns konformációhoz tartozó klaszter méret a következő: 1-es klaszter 4751 klaszter méret, 28-as klaszter 516 klaszter méret, 56-os klaszter 685 klaszter méret, 58-as klaszter 1724 klaszter méret. Az első 58 legpopuláltabb klaszter szimulációs időarány eloszlását mutatja a 26. ábra.

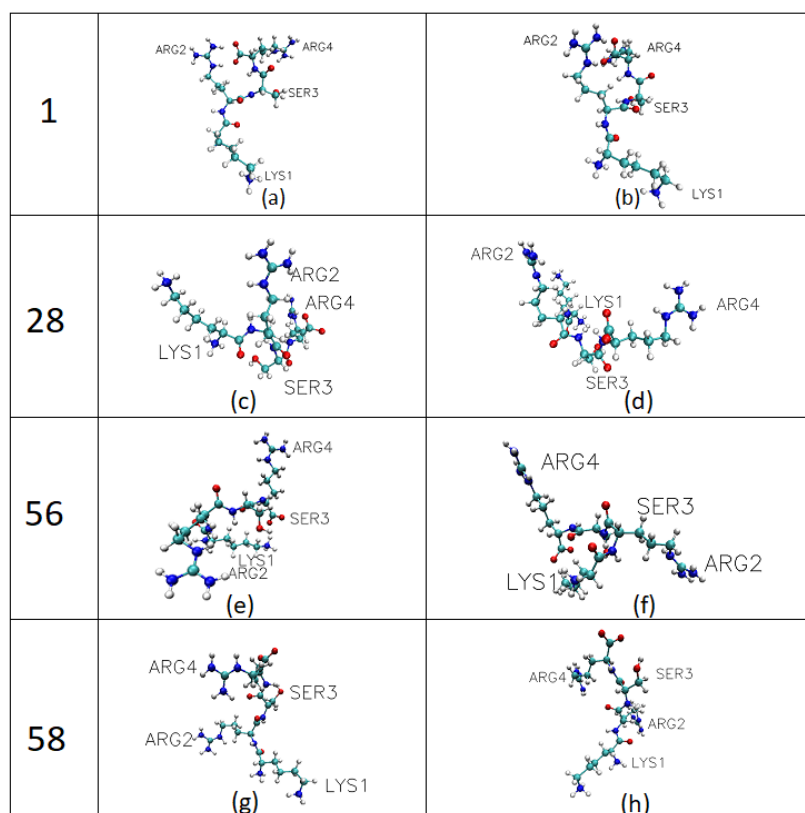


26. ábra: Az első 58 molekula konformációhoz tartozó szimulációs időarány. A konformációs időarány a molekula az adott geometriában töltött összes idejének a teljes szimulációs időhöz képesti aránya.

A REMD eredménye azt mutatja, hogy a KRSR molekula az anatóz felületen az 1-es klaszterre jellemző molekula konformációban töltötte az ideje 40%-át. A többi domináns

molekula konformációban töltött idő ehhez képest jóval kevesebb, a 28-as 5%, az 56-os 5% és az 58-as konformáció 18%-ban jelent meg a teljes szimulációs időhöz viszonyítva. A legnagyobb populációjú 1-es klaszter - Boltzmann eloszlást feltételezve - a legalacsonyabb energiájú állapotot adja.

A 27. ábra a leggyakrabban előforduló négy klaszter konformációhoz tartozó molekula alakokat mutatja két nézetből. Az előző alfejezetben leírt megfigyeléseknek megfelelően a felületen való megtapadásban fontos szerepet töltenek be a KRSR peptid töltött részei (Lys, Arg). Különösen az N-terminális (Lys) rész szerepe fontos ezen állapotokban. Az egyes molekula konformációk közötti eltérés a molekula alakjában látszik. A különböző molekula konformációk jellegzetesen olyan állapotokat mutattak, ahol a KRSR molekula például hídszerű állapotot vesz fel (N-terminális és C-terminális is tapad a felületre, a peptidlánc középső része pedig a vizes fázisban helyezkedik el), illetve csak az N-terminális vagy csak a C-terminális rész tapad a felülethez (a további részek ekkor a vizes fázisban találhatók).



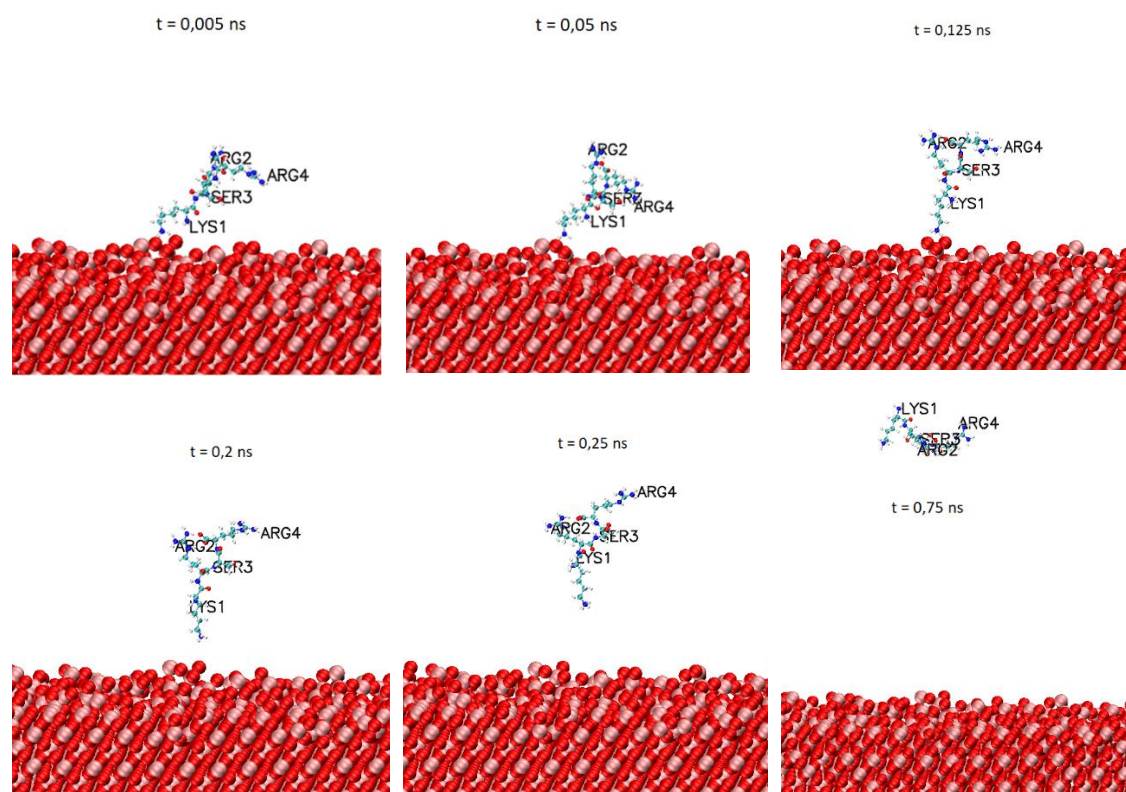
27. ábra: A négy legdominánsabb KRSR peptid konformáció a REMD során két különböző nézetből. Az anatóz felület alul helyezkedik el. Bal oldalt a klaszterek sorszámai láthatók.

Összegezve meghatároztam a KRSR tetrapeptid molekula konformációit az anatóz TiO₂ felületen REMD módszerrel. Ezek megfelelnek a KRSR molekula lehetséges energia állapotainak a TiO₂ felületén. A 310 K-re jellemző különböző molekula konformációkat single linkage RMSD klaszterezéssel térképeztem fel. Ezen klaszterek közül az 1-es konformációs állapot volt a legnagyobb populációjú. Boltzmann eloszlást feltételezve ez a molekula konformáció a legalacsonyabb energiájú állapot. A további molekula-elhúzási szimuláció és umbrella sampling során ezzel a leggyakoribb állapottal dolgoztam tovább. Általában az egyes klaszterek reprezentánsaként a klaszter átlagos molekula szerkezetéhez képest legkevésbé eltérőt szokás megadni, amelynek így a legkisebb átlagos távolsága van a többihez képest.

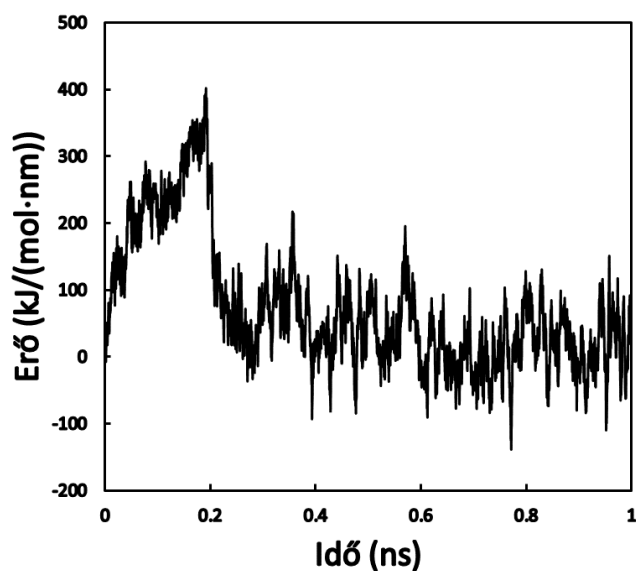
5.3 Anatózhoz kötött KRSR peptid elhúzás szimulációja, a kötési szabadentalpia meghatározása

A REMD eredményeül kapott legnagyobb előfordulási gyakoriságú KRSR molekula konformációt további elhúzási szimulációhoz, mint kiindulási állapot használtam fel. Ebben a konformációs állapotban lévő molekulát a szimuláció során a TiO₂ felületre merőleges tengely mentén húztam el. A húzást egy harmonikus potenciál (rugó potenciál) segítségével valósítottam meg. A molekula tömegközéppontjára ható, $1000 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{nm}^2} \approx 1,66 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ rugóállandóval jellemezhető harmonikus potenciállal húztam a molekulát, amelynek a távolodási sebessége a felülettől $5 \frac{\text{nm}}{\text{ns}}$ volt. A teljes elhúzási eljárás 1 ns-ig tartott, azaz ezzel a sebességgel 5 nm-re húztam el a felülettől a molekulát. A 28. ábra pillanatképeket tartalmaz a húzásról különböző időpontokból.

Az elhúzási folyamat során továbbra is kölcsönhatásban van a KRSR molekula a környezetében lévő vízmolekulákkal, illetve ionokkal, valamint kezdetben a TiO₂ felületet alkotó atomokkal is. Az elhúzás során a molekula tömegközéppontjára kifejtett erő változik, a kezdeti állapotban a molekula még tapad a felülethez és a rugó, ami a megadott sebességgel távolodik egyre nagyobb erőt fog kifejteni egészen addig, amíg a molekula el nem szakad a felülettől. Ezt a kifejtett erőt az idő függvényében a 29. ábra mutatja.



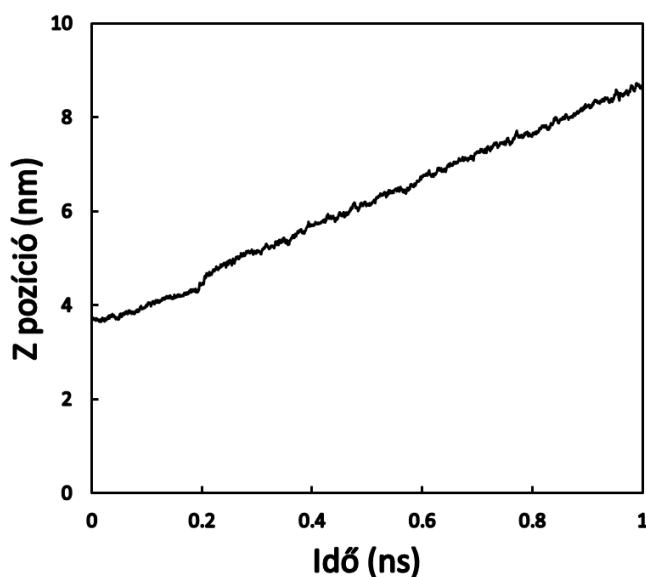
28. ábra: Pillanatképek a KRSR molekula TiO_2 felülettől való elhúzásáról.



29. ábra: A KRSR molekula tömegközéppontjára kifejtett erő az elhúzási szimulációs idő során az idő függvényében.

A KRSR molekula TiO_2 felülettől való elszakadáshoz szükséges kritikus erő értéket $\sim 0,2$ ns-nál éri el az elhúzási szimuláció során. Ekkor a felülettől elszakad a molekula, és

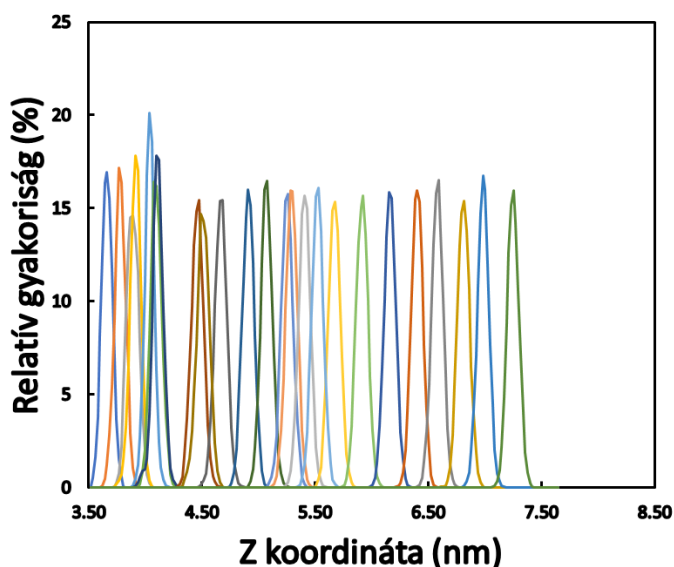
hirtelen lecsökken az erő értéke. A további szakaszban a KRSR peptid a vízmolekulákkal hat kölcsön, és az ebből következő zaj jelenik meg a görbén. A legnagyobb erőérték $400 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{nm}} \approx 664,2 \text{ pN}$, ami az elszakításhoz szükséges. A szakadás utáni oszcillációk kapcsán megjelenő erő -100 és $+100 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{nm}}$ között változik ($100 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{nm}} \approx 166,1 \text{ pN}$). A 30. ábra az elhúzás során a KRSR molekula tömegközépponti pozíciójának időbeli változását ábrázoltam. A nulla időpontban a tömegközéppont a felület felett található $z=3,7 \text{ nm}$ magasságra. Az idő előrehaladtával megfigyelhető, ahogy a molekula tömegközéppontja fokozatosan távolodik a felülettől egészen $8,7 \text{ nm}$ -ig amelyet 1 ns -nál ér el. Ez idő alatt a görbe meredeksége lényegesen nem változik, azonban $\sim 0,2 \text{ ns}$ -nál látszik rajta egy ugrás. Ez időben megfelel a 29. ábrán látható hirtelen erőcsökkenésnek, ami jól mutatja, hogy ekkor szakad el a molekula a felülettől. A görbe csak kissé tér el az egyenestől, kisebb kilengések figyelhetők meg rajta, amelyek a vizes környezettel való kölcsönhatásból adódnak.



30. ábra: A molekula-tömegközéppont TiO_2 felülettől való távolsága az idő függvényében az elhúzási szimuláció során.

Az elhúzás után mintavételezést (umbrella sampling) végeztem 24 különböző pozícióban. Ehhez először a felületre merőleges tengely mentén megvizsgáltam a KRSR molekula tömegközéppontjának távolodását és kijelöltem 24 különböző pozíciót. Ezek az elhúzási szimulációs adatsor különböző időpillanatainak feleltek meg. A kijelölt pozícióknak megfelelő állapotokat használtam kiindulásként, és a mintavételezés során

egy $1000 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{nm}^2} \approx 1,66 \text{ N/m}$ rugóállandóval jellemezhető harmonikus potenciál segítségével tartottam a KRSR molekula tömegközéppontját egy helyben. Az egyes mintavételi szimulációk során először egy rövid 1,2 ns egyensúlyi állapot keresést végeztem el, majd egy-egy 10 ns szimulációs időhosszúságú (azaz a teljes mintavételezési idő 240 ns), 2 fs lépésközű MD szimulációt indítottam. A KRSR molekula a környezetet alkotó vízmolekulákkal és ionokkal kölcsönhatva el tud mozdulni a harmonikus potenciállal rögzített helyzethez képest, azonban a harmonikus potenciál visszahúzza a molekulát úgy, mint egy rugó. A tömegközéppont kitérések egy normális eloszlást írnak le, ezeket a 24 különböző mintavételezési szimuláció esetére a 31. ábra tünteti fel. Az ábrán a KRSR molekula tömegközéppont felülettől való távolságának eloszlása látható a felületre merőleges tengely mentén.

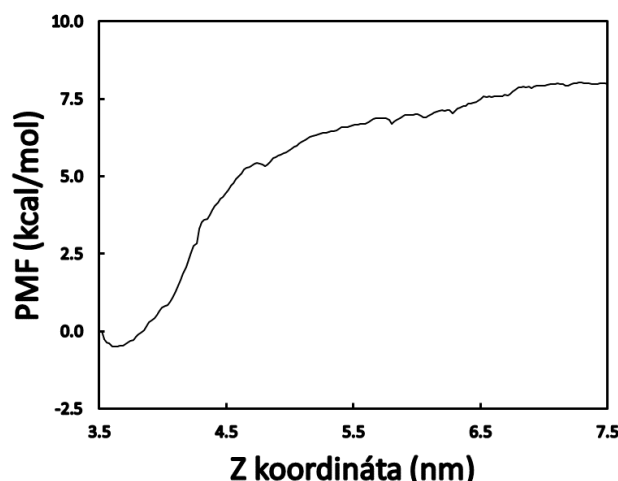


31. ábra: A 24 mintavételezési szimuláció során az egyes pozíciókhoz tartozó tömegközéppontok felülettől való távolságeloszlása.

A későbbi kötési szabadentalpia kiértékeléshez a teljes elhúzási tengely mentén át kell fednie a különböző pozíciókhoz tartozó normális eloszlásoknak. Ez alól általában, így az én modellezésem során is, kivételt képez az a pont, amikor éppen elszakadt a molekula a TiO_2 felülettől.

A GROMACS-ba beépített WHAM algoritmussal az egyes mintavételezési pontokban számolt átlagos erőkhöz tartozó potenciálértéket (PMF) meghatároztam a felületre merőleges (z) tengely mentén. A felülettől távolodva ez az érték változik, mivel

a felület – különösen az elszakadás után – egyre kevésbé van hatással a KRSR molekulára. A 32. ábrán ábrázoltam az egyes mintavételezési pontok esetében kiszámolt átlagos erő potenciálértékeket (PMF) a felületre merőleges tengely z pozíciója függvényében.



32. ábra: A mintavételezési pontokban számolt átlagos erő potenciálértéke (PMF) a felületre merőleges tengely Z pozíciója függvényében.

A 32. ábrán látható PMF görbe alapján megadható a ΔG szabad kötési szabadentalpia, a legalacsonyabb és legmagasabb pontja közötti különbséget képezve. A KRSR molekula - anatóz TiO_2 felület esetén a kötési szabadentalpiára $\Delta G = 8,817 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}} \approx 36,89 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \approx 0,3823 \text{ eV}$ kaptam. Ez az érték a másodlagos kémiai kötések nagyságrendjébe esik.

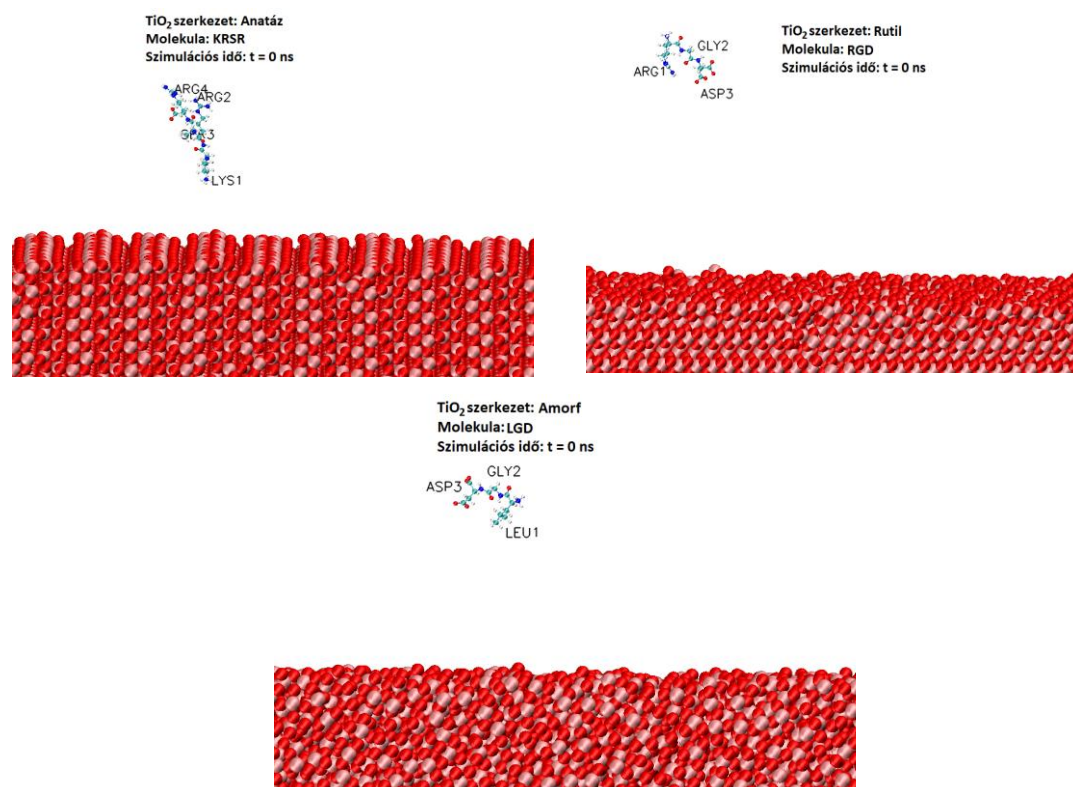
Arcangeli és munkatársai tanulmányuk során egy a KRSR-nél jóval nagyobb, 13 aminosavból álló peptidet húztak el az anatóz (101) TiO_2 felülettől elhúzás szimulációval [79]. A nagyobb molekula esetén az elhúzási görbe felfutó része mintegy 400 ps alatt elért $\sim 1500 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{nm}}$ erő értékig, majd csökkenni kezdett 1 ns-ig (esetemben 200 ps alatt $\sim 400 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{nm}}$ -ig nőtt az erő érték).

Lemkul korábban az Alzheimer-kór esetében szerepet játszó amyloid protofibrilt alkotó β peptidekkel végzett elhúzási szimulációt [80]. Az elhúzás után hasonlóan az itt leírtakhoz, umbrella samplinget végzett 31 pontban 10 ns-on át. Majd meghatározta a PMF görbét és a ΔG kötési szabadentalpiát, amely a peptidektől függően 37 kcal/mol és 50 kcal/mol közötti tartományban mozgott. Ez az érték többszörös az általam

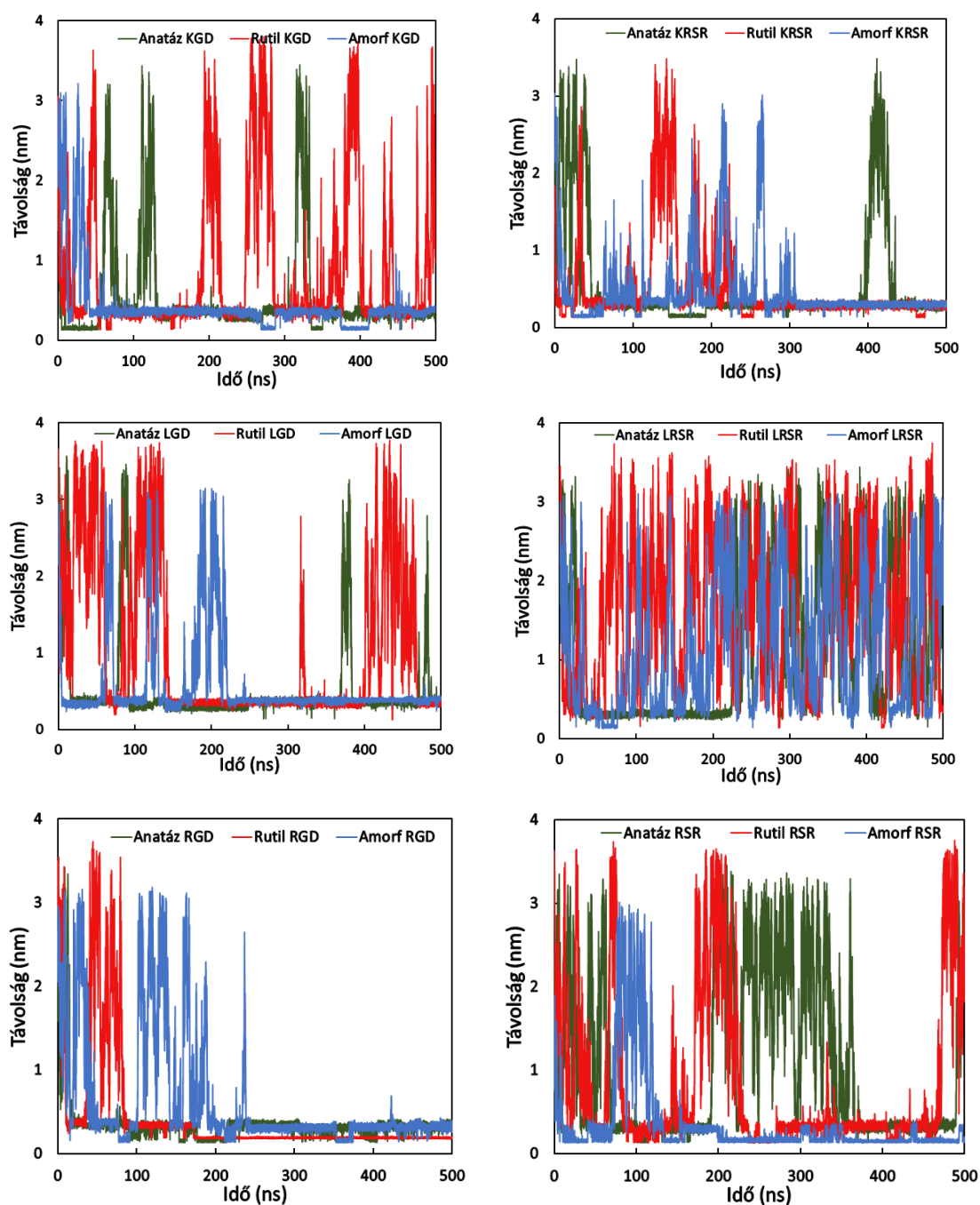
meghatározott a KRSR – anatóz rendszert jellemző kötési szabadentalpiához ($\Delta G = 8,817$ kcal/mol) képest, ami a modellezett molekula méretek és kötési jellegzetességek különbségeivel magyarázható.

5.4 Peptidek szisztematikus összehasonlítása a TiO_2 felületeken MD szimulációk segítségével

Az előzőekben bemutatott KRSR peptid anatóz felszínnel történő kölcsönhatásának MD vizsgálatán túl további szimulációkat végeztem hat peptiddel. Ezek egyrészt az RGD és módosított változatai a KGD és LGD, továbbá a már vizsgált KRSR molekula és ennek módosított változata az LRSR és a rövid változata az RSR. Szisztematikusan vizsgáltam e molekulák megtapadását a kristályos anatóz és rutil, valamint egy befagyott folyadékstruktúrájú amorf TiO_2 felületen külön-külön 500 ns szimulációs idejű MD szimulációk szuperszámítógépes futtatásával.



33. ábra: Néhány pillanatkép a kezdeti szimulációs állapotokról. A képek a peptid jobb láthatósága érdekében a vízmolekulákat nem mutatják.



34. ábra: A különböző biomolekulák (KGD, KRSR, LGD, LRSR, RGD, RSR) legközelebbi atomjának távolsága az anatáz, rutil és amorf TiO_2 felülettől az idő függvényében.

A peptideket a felülettől kezdetben 2 nm-es távolságra helyeztem el. A szimuláció során a Brown mozgásnak megfelelő bolyongást végeztek a vizes környezetben és kölcsönhatásba kerültek a különböző szerkezetű TiO_2 felületekkel. A 33. ábra néhány kezdeti állapotot mutat a különböző TiO_2 struktúrákon.

A 34. ábra az elkészített kristályos anatáz, rutil és a folyadékstruktúrájú amorf TiO_2 felületek és a különböző peptidek legközelebbi atomjainak távolságát mutatja a szimulációs idő függvényében. A peptid a TiO_2 felület közvetlen közelében töltött idejét tekintetben az adszorpciós időnek. A 34. ábra alapján az adszorpciós idők a felület és a peptid típusától függően a jelentősen eltérnek, és a karakterisztikus kötési távolságok is jelentősen eltérhetnek.

A 34. ábrán látható grafikonok értelmezéséhez először a legelső grafikon, a KGD molekula, majd két jobban és végül egy kevésbé tapadó molekula távolságváltozásait tekintem át. Tekintsük először a 34. ábra első grafikonján a kék görbét, ami az amorf felület és a KGD molekula a felülethez legközelebbi atomja közötti távolságot jelöli. A grafikonon látható, hogy a molekula 2 nm távolságtól indul el, majd tranziens változások figyelhetők meg, ami a vizes közegben való bolyongást jelenti. A KGD peptid 12,5 ns környékén megközelíti a felületet és rögtön vissza is tér a vizes fázisba. Végül 42 ns-tól egy stabil rögzülés alakul ki: a KGD molekula az amorf felülethez tapad, és csak kis oszcillációk figyelhetők meg a távolság-idő görbén. Ez a távolság $0,36 \pm 0,16$ nm (42 és 500 ns között) ami egy vízmolekula mediálta kötést jelent, azaz a molekula a felülethez kötődött vízmolekulához köt hidrogén-híd kötéssel. Ezen kívül két alkalommal közelebbi távolságot vesz fel a molekula viszonylag kevés ideig, amely közvetlen kötődést jelent a felületet alkotó atomokhoz. Ez a $0,151 \pm 0,009$ nm (269 és 288 ns között) és $0,149 \pm 0,008$ nm (372 és 411 ns között) távolság. Összehasonlítva a KGD – amorf TiO_2 adszorpciós szimulációt mutató görbét az anatáz és rutil görbékkel, az látható, hogy az anatáz és rutil felülettől a KGD molekula gyakrabban eltávolodik bizonyos idő után, vissza a vizes fázisba. Ez többször is megtörténik az 500 ns szimuláció során, a rutilon három, míg az anatázon hat ilyen eltávolodás figyelhető meg. Az anatáz és rutil felületeken egyaránt megfigyelhető a jellegzetes víz mediálta felülethez tapadás és közvetlen felületre tapadás is. Az anatáz felületen a vízmolekulák hidrogénkötéseinek keresztüli kötés távolsága $0,34 \pm 0,05$ nm (133 és 313 ns között), a rutilon $0,352 \pm 0,019$ nm (70,5 és 184 ns között). A közvetlen felületre kötődés távolsága anatázon $0,15 \pm 0,007$ nm (336 és 350 ns között) és a rutilon $0,153 \pm 0,009$ nm (64,2 és 65,8 ns között).

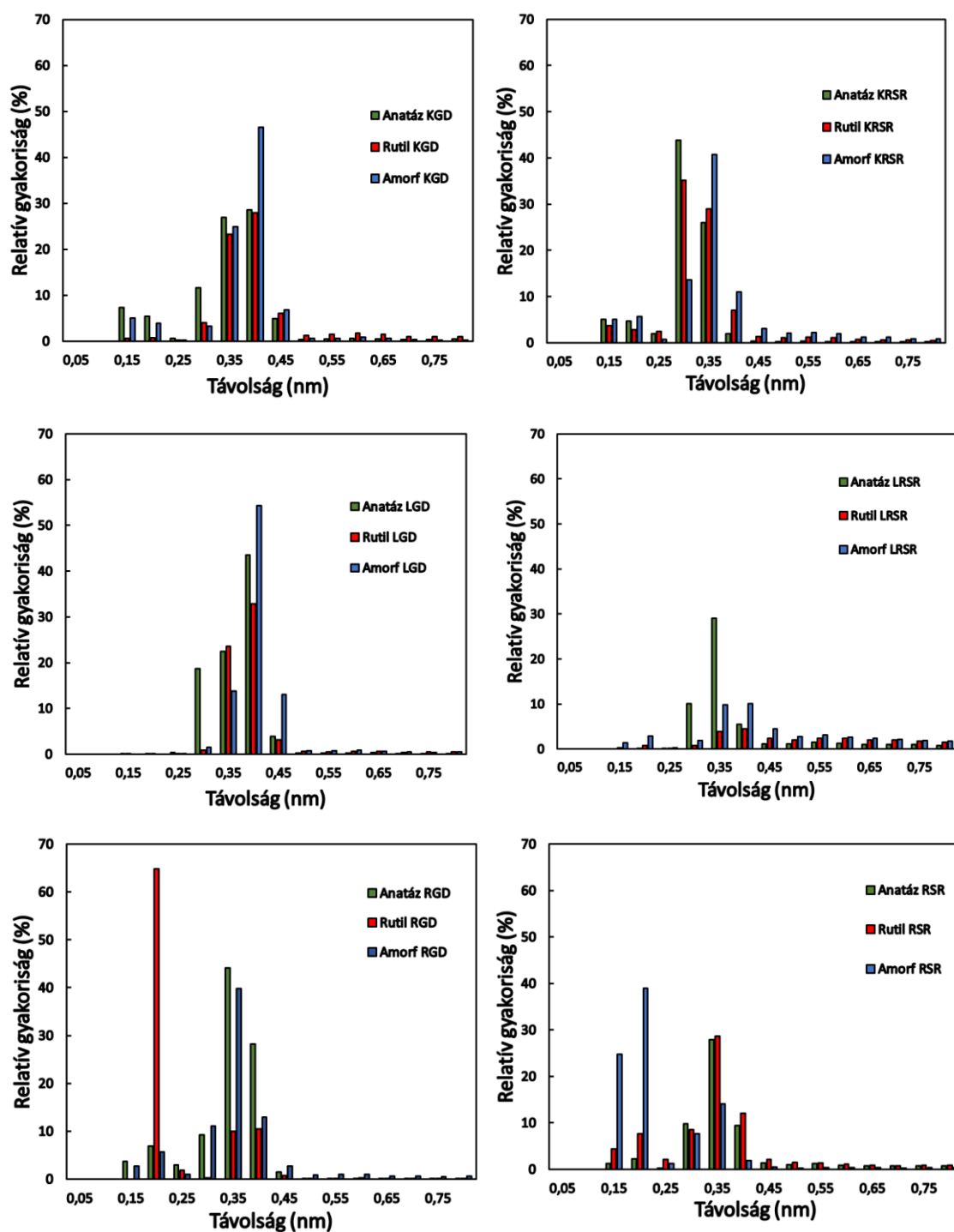
Az RGD tripeptid tapadását TiO_2 felületekre az irodalomban már széles körben vizsgálták MD módszerekkel. Általánosságban az RGD mind az N-terminálisával és a C-terminálisával meg tud tapadni, amely a peptid első és utolsó aminosav része. Ez esetben

is főleg a töltött oldalláncok, az aminocsoport és az utolsó aminosav részen található karboxilcsoportok azok, amelyek jellegzetesen részt vesznek a kölcsönhatásban. Az RGD stabil tapadást tud kialakítani a TiO_2 felületeken. A 34. ábrán az 500 ns szimuláció második felében mind a háromfajta felületen a kötési távolságban tartózkodik az RGD molekula. A rutil felület azért emelkedik ki a többi kettő közül, mert hosszú, szoros kötődés figyelhető meg a szimuláció során. Az RGD rutilra való stabil közvetlen kötődése előtt egy vízmolekulán keresztüli tapadás figyelhető $0,34 \pm 0,05$ nm távolságban (89 és 172 ns között). Ezután az RGD közvetlen tapadása figyelhető meg, a távolság: $0,19 \pm 0,004$ nm (172 és 500 ns között). Az anatázon és amorf felületen ehhez képest az RGD a vízmolekulán keresztüli és a közvetlen kötődéshez tartozó két távolságot gyakrabban váltogatja.

A KRSR tetrapeptid mind a háromfajta TiO_2 felületen stabilan tudott megtapadni a teljes 500 ns szimulációs idő nagy részében. Hosszabb időskálán megfigyelhetők ebben az esetben is elszakadások és eltávolodások a felülettől. Az amorf TiO_2 felszíntől többször is eltávolodik a KRSR molekula, míg az anatáz és rutil kristályos felületekről csak egy és három alkalommal. Az anatáz felületen a KRSR a vizes fázisban bolyongva megközelíti a felületet többször, de csak 50 ns környékén tapad meg azon. Hasonlóan az első szimulációhoz, a felülethez tapadás elején vízmolekula által mediált kötődés figyelhető meg $0,3 \pm 0,04$ nm távolságban (47,38 és 145,26 ns között), majd a KRSR közvetlenül kötődik $0,152 \pm 0,019$ nm távolságban (145,26 és 192,72 ns-ig). Az 500 ns alatt azonban a közvetlen kötési távolságtól visszatér $0,289 \pm 0,024$ nm távolságba mintegy 200 ns-ig (192,72 és 390,78 ns között), majd egy kitérés figyelhető meg a vizes fázisba és ezután újra megtapad a felületen. A rutil felületen a KRSR távolsága szintén mintegy 200 ns-on keresztül $0,29 \pm 0,02$ nm (254 és 462 ns között), ami egy vízmolekulán keresztül megvalósuló kötődés, majd a szimuláció végén ~ 10 ns ideig közvetlenül tapad $0,15 \pm 0,008$ nm távolságnál (462 és 473 ns között). Az amorf felületen szintén többször megfigyelhető ez a jelenség, az utolsó 150 ns-ban a molekula távolság $0,31 \pm 0,03$ nm (307,32 és 500 ns között).

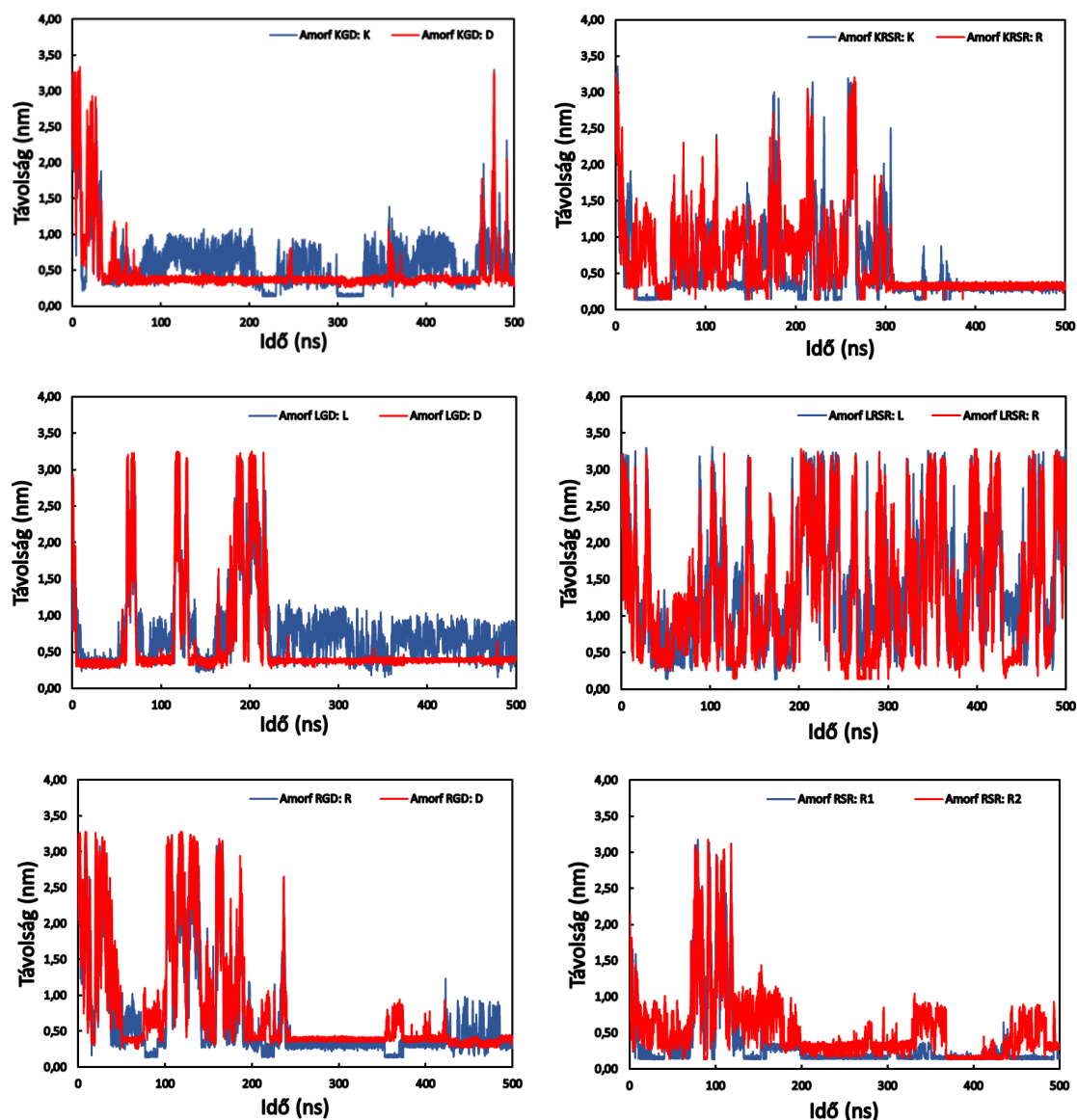
Az LRSR peptid esetén az első aminosav, a leucin nem rendelkezik töltéssel és ez jelentős hatással van a felületen kialakuló kölcsönhatásokra. A KRSR peptidhez képest többször eltávolodik a TiO_2 felülettől. Megfigyelhető, hogy az LRSR az 500 ns szimulációs idő során jelentős időt tölt a vizes fázisban. Az LRSR esetén főleg

vízmolekulán keresztüli tapadás figyelhető meg. Rövid ideig tartó, közvetlen felülethez való tapadás is mind a három esetben megfigyelhető.



35. ábra: A különböző felületek és peptidek esetében a felülethez legközelebbi atomjai távolságának eloszlása a teljes szimulációs időhöz viszonyítva.

A 35. ábra mutatja a teljes 500 ns szimulációs időre tekintve a távolságok eloszlását jellemző hisztogramokat. A jellegzetes karakterisztikus távolságoknál megfigyelhetők relatív gyakoriság kiugrások. Az RGD esetén rutilon például az ideje mintegy 65%-át tölti a 0,2 nm közelében és további 10-10%-ot 0,35 és 0,4 nm-nél. A maradék 15%-ot az egyéb, távolabbi állapotok teszik ki.

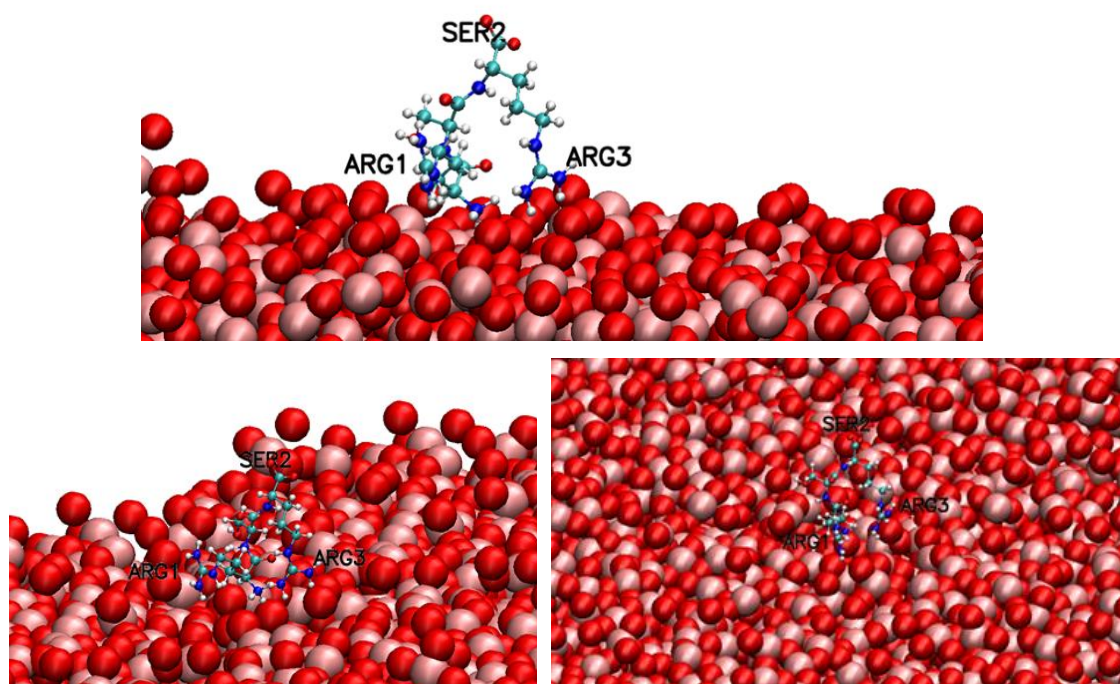


36. ábra: Az amorf TiO_2 felülettől az első és utolsó (N-terminális és C-terminális) aminosav részek távolsága az idő függvényében a különböző peptidek esetén.

A további elemzés céljából megvizsgáltam a tri- és tetrapeptid molekulák első és utolsó aminosav részeinek (N-terminális és C-terminális) távolságát is a TiO_2 felületektől. Először az amorf felületre vonatkozó távolság – idő grafikonokat mutatom be a 36. ábrán.

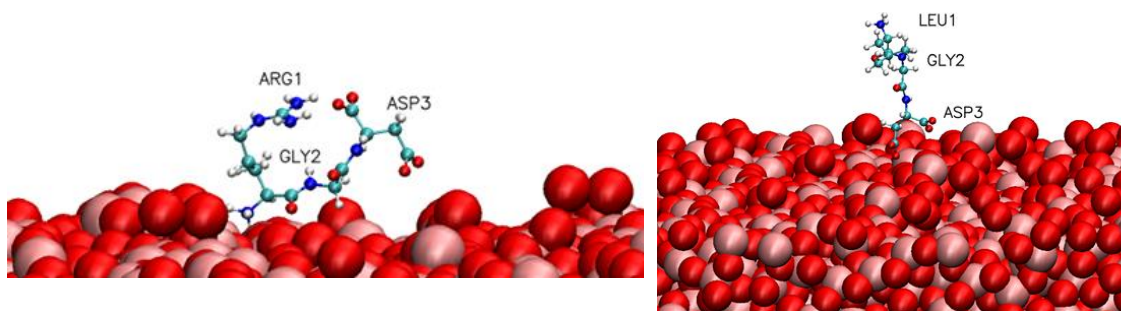
Az ábra grafikonjai információt adnak arról, hogy a peptidek milyen állapotban vannak a felületen, a molekulák melyik végükkel tapadnak a felülethez. Többek között megfigyelhetők hídszerű állapotok is, ahol az első és utolsó aminosav részek is megtapadnak a felületen és a molekula középső része nyúlik át a vizes fázisba. Ilyen állapot figyelhető meg az RSR esetén az amorf TiO_2 felületen 400 ns-nál, azaz az első és utolsó terminális aminosav is közel található a felülethez.

A 37. ábra különböző irányokból mutatja ennél az időpillanatnál (400 ns) az RSR molekulát az amorf TiO_2 felületen. A molekula láthatósága érdekében a vízmolekulákat a képeken nem jelenítettem meg.

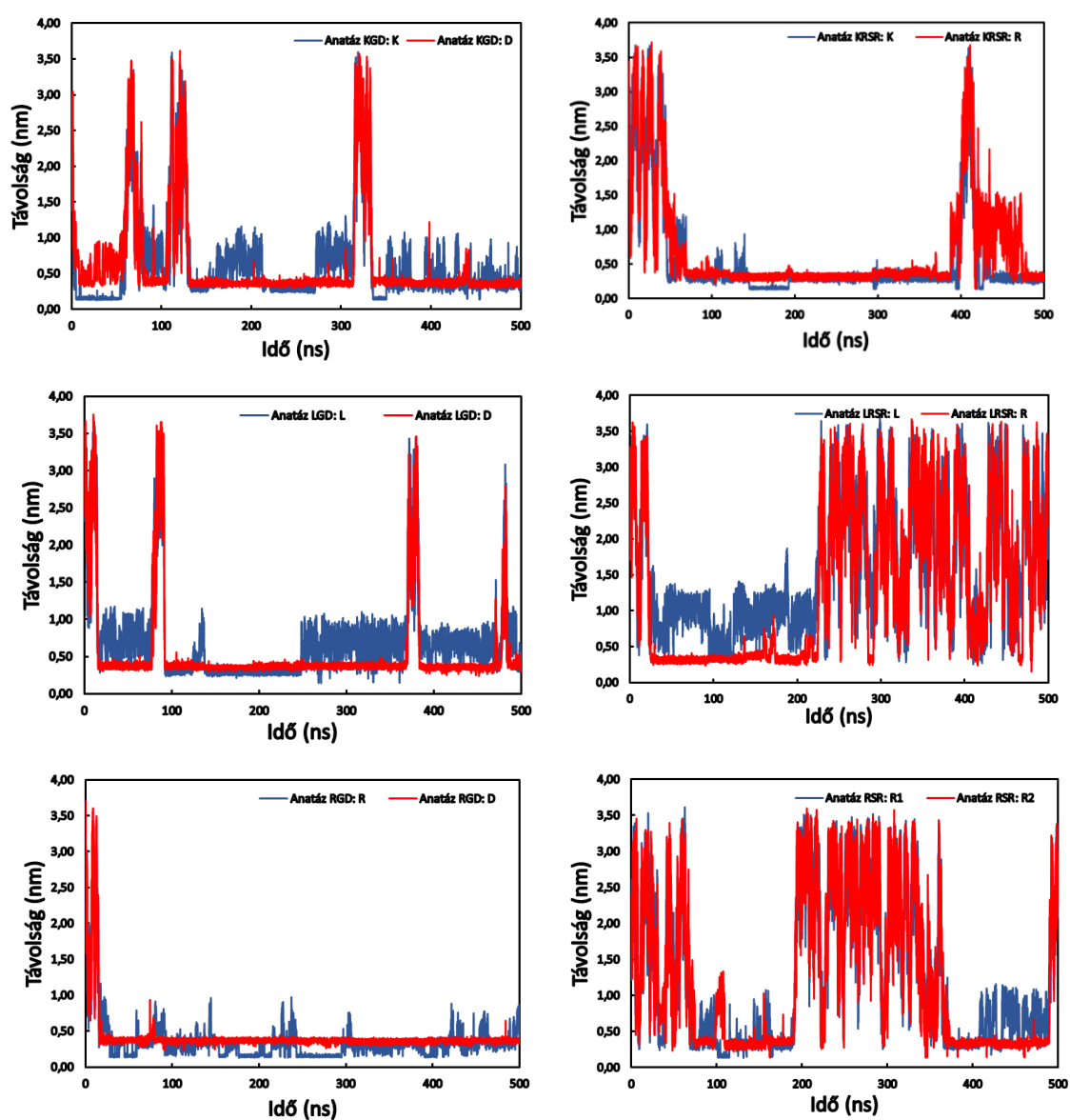


37. ábra: Az RSR peptid az amorf TiO_2 felületen különböző irányokból tekintve a $t=400$ ns szimulációs időpontban. A felső képen figyelhető meg a molekula hídszerű állapota.

A 38. ábra olyan állapotot mutat ahol az 500 ns szimuláció alatt az RGD peptid az első aminosav rész (arginin) a töltött oldalláncával tapad meg az amorf TiO_2 felületen, $t=80$ ns szimulációs időpontban. Továbbá, a 38. ábra jobb oldali képén egy olyan LGD állapot látható, ahol az LGD peptid C-terminális aminosav (Asp) karboxilcsoportjával tapad meg az amorf TiO_2 felületen, $t=220$ ns időpontban.

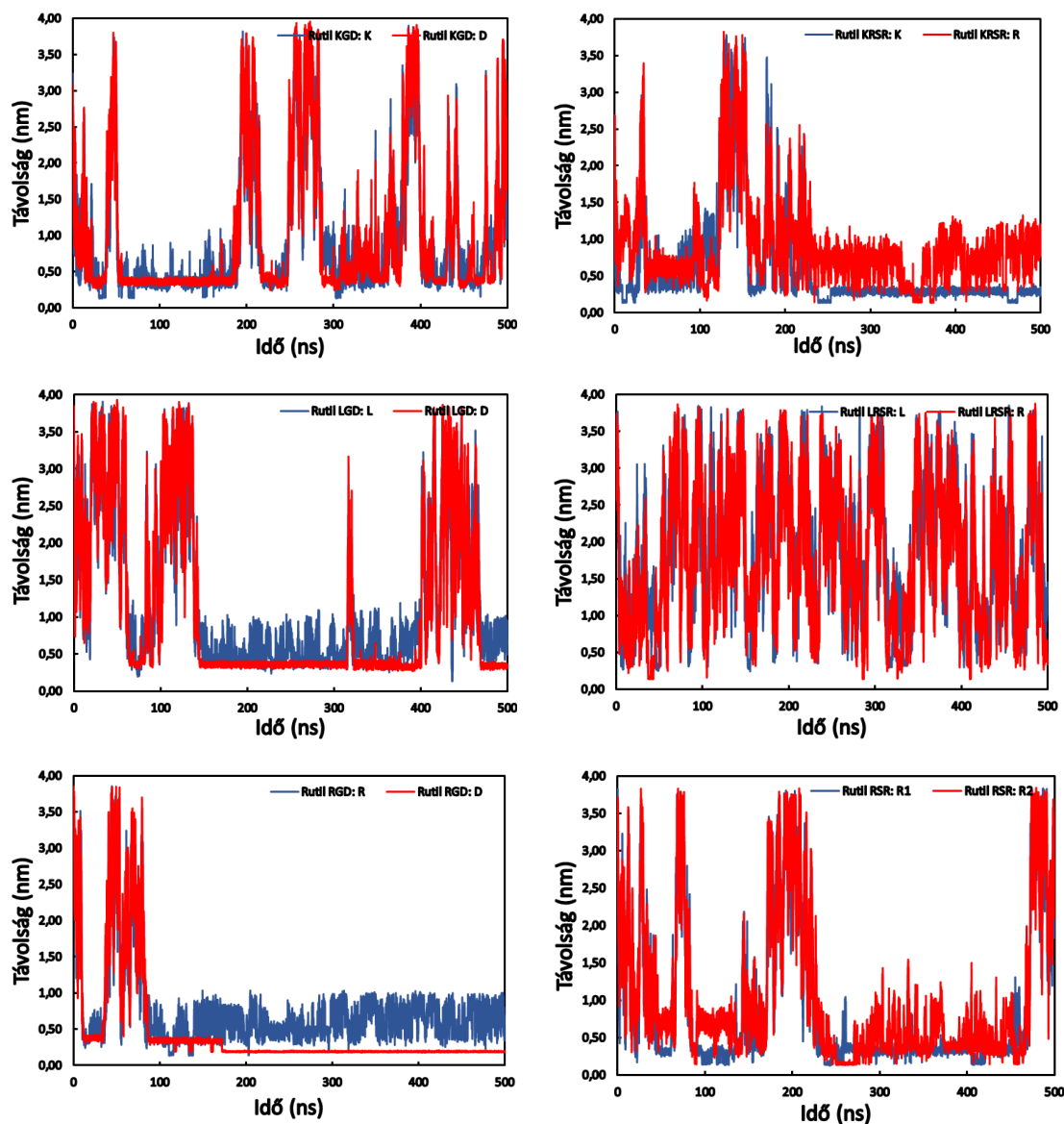


38. ábra: Az RGD $t=80$ ns és LGD $t=220$ ns tapadása az amorf TiO_2 felülethez. A felületet alkotó atomokat VDW, a peptideket pedig CPK reprezentációban mutatom.



39. ábra: Különböző peptidek esetén az első és utolsó aminosav részek távolsága a kristályos anatóz felülettől az idő függvényében.

A 39. és 40. ábrákon az anatáz és rutil krisályos TiO_2 felülethez tapadó peptidek első és utolsó (N-terminális és C-terminális) aminosavjainak a felülettől való távolsága látható az idő függvényében. Hasonlóan az amorf felület eredményeihez, itt is megfigyelhetők olyan állapotok, ahol mind a két terminális rész letapad a felületre, mint például a az RGD anatázon, szinte az teljes szimuláció alatt, vagy a KRSR a rutil felületen 360 ns-nál.

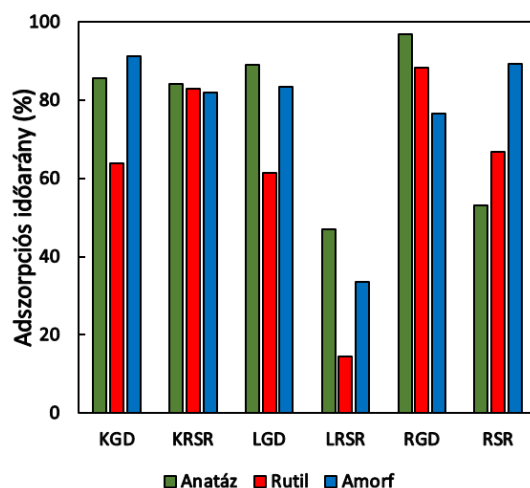


40. ábra: A rutil felülettől az első és utolsó aminosav részek távolsága az idő függvényében a különböző peptidek esetén.

Megfigyelhetők továbbá olyan állapotok is, amikor csak az N-terminális végével tapad a molekula; például KRSR az anatáz felületen 450 ns-nál vagy szintén a KRSR a rutil felületen 300 ns-nál. Megvalósulhat azonban a C-terminálissal való tapadás is,

például a KGD az anatáz felületen 180 ns-nál vagy az RGD a rutilon 200 ns-tól a C-terminálissal kötődik a TiO_2 felülethez. Az LRSR esetén mind az első és utolsó aminosav rész kiugróan keveset van a felülethez közeli állapotban, leginkább a vizes fázisban található a szimuláció során.

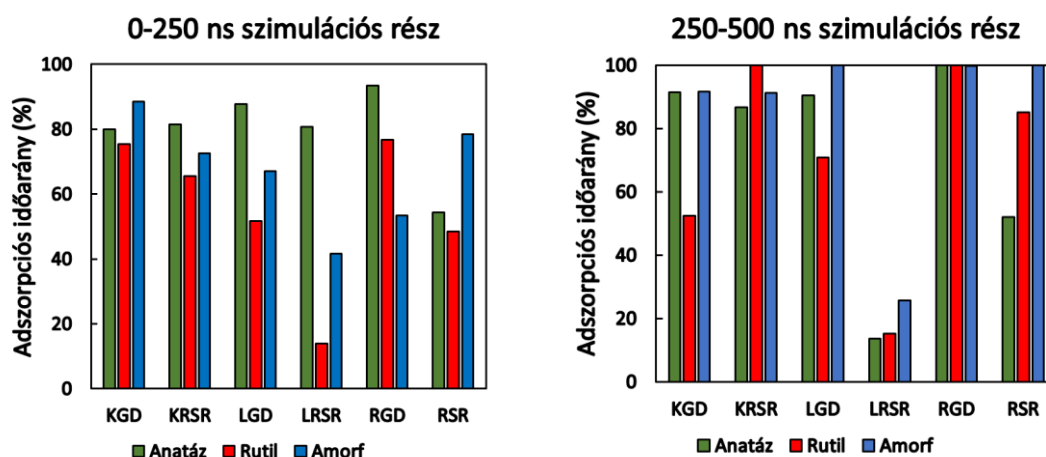
A felszínhez való tapadás számszerűsítése céljából bevezetett adszorpciós időarányt meghatároztam mind a hat peptidekre a különböző TiO_2 felületek esetében. Az adszorpciós távolságot a felülethez képest 0,5 nm-nek határoztam meg és kiszámítottam az ezen adszorpciós távolságon belül töltött szimulációs időt a teljes szimulációs időhöz képest. A 41. ábra mutatja a kiszámított adszorpciós időarányokat.



41. ábra: A vizsgált peptidek adszorpciós időarányai a teljes szimulációs időre vonatkoztatva anatáz, rutil és amorf TiO_2 felületeken

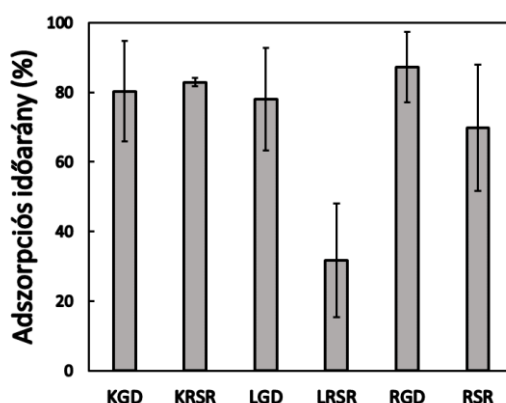
Látható, hogy a legalacsonyabb adszorpciós időarányt az LRSR molekula esetén kaptam, 47,03%-ot az anatáz felületen és kevesebb mint felét, 14,5%-ot a rutil felületen, az amorf TiO_2 felületen pedig 33,62%-ot. Az adszorpciós időarány a többi molekulára nézve nagyobb volt. A KRSR és az RGD molekulákra kaptam a legnagyobb értékeket, az előbbire 82,93% az utóbbira 87,26% volt átlagosan a három felület tekintetében. A KRSR molekula adszorpciós időaránya a három felületre nézve hasonló értékű volt, a legnagyobb, 84,11% anatázon, majd 82,82% a rutilon és 81,85% az amorfon. Az RGD esetén volt eltérés az értékek között, a legnagyobb az anatázon volt, 96,76%, 88,39% a rutilon és 76,63% az amorf felületen. Az eredmények között még kiugró a KGD molekula amorf felületen megvalósult adszorpciója; ekkor 91,26% volt az adszorpciós időarány.

Az 500 ns szimulációk esetén megvizsgáltam az első 250 ns felére és második 250 ns felére külön az adszorpciós időarányokat. A 42. ábra mutatja ezeket az adszorpciós időarány eredményeket:



42. ábra: Adszorpciós időarányok a szimulációs idő első 250 ns és második 250 ns-os időintervallumában.

A szimulációs idő első felére jellemző a vizes fázisban való bolyongás, ami után a peptidek „megtalálták” a TiO_2 felületet. A szimulációk második 250 ns felében több olyan molekula is volt, amely 100%-os adszorpciós időaránnal rendelkezik, azaz a távolsága a felülettől nem haladta meg a 0,5 nm értéket. Ilyen például az RGD mind a három TiO_2 felületen, a KRSR rutilon vagy az LGD és RSR az amorf TiO_2 felületen. Megfigyelhető, hogy az LRSR a szimulációs idő második felében is kis adszorpciós időaránnal rendelkezik mind a három felület esetén.



43. ábra: Az adszorpciós időarány három TiO_2 felületre számított átlaga a vizsgálatba bevont hat peptid esetében. A hibasávok a szórás értékét mutatják.

A korábban a különböző peptidekre meghatározott adszorpciós időarányokat átlagoltam a három felülettípusra, a 43. ábra ezt mutatja, melyen a szórás is feltüntettem. A legalacsonyabb átlagos adszorpciós időarányt a három TiO₂ felületre az LRSR esetében kaptam (31,72±16,34%). A legnagyobb átlagos értékeket a KRSR és RGD esetén kaptam, előbbinél 82,93±1,13%-ot, utóbbinál 87,26±10,11%-ot.

5.5 Peptidek adszorpciója TiO₂ felületeken, a kötési energiák meghatározása

Az előző alfejezetben ismertettem hat peptid (KGD, KRSR, LGD, LRSR, RGD, RSR) kapcsolódását különböző TiO₂ felületekhez (anatáz, rutil és amorf), 500 ns szimulációs idejű MD számolások eredményeit és tapasztalatait. A peptidek adszorpciója után a molekulák már egy kötöttebb állapotban vannak a vizes fázisbeli állapothoz képest, ezért a peptid molekulák konformációja már kevésbé változik.

Felület	Peptid	Átlagos RMSD (nm)	RMSD szórás (nm)	Minimális távolság a felülettől (nm)	Minimális távolsághoz tartozó időpont (ns)
Anatáz	KGD	0,230	0,043	0,126	28,54
	KRSR	0,336	0,041	0,131	149,24
	LGD	0,215	0,033	0,142	270,96
	LRSR	0,303	0,055	0,151	479,90
	RGD	0,280	0,063	0,134	197,50
	RSR	0,266	0,051	0,133	113,90
Rutil	KGD	0,268	0,046	0,133	70,48
	KRSR	0,296	0,052	0,131	472,18
	LGD	0,236	0,026	0,195	73,48
	LRSR	0,313	0,076	0,138	285,82
	RGD	0,260	0,060	0,178	365,10
	RSR	0,288	0,066	0,130	243,04
Amorf	KGD	0,241	0,041	0,131	393,62
	KRSR	0,299	0,041	0,128	34,78
	LGD	0,222	0,036	0,220	158,74
	LRSR	0,303	0,055	0,130	56,84
	RGD	0,273	0,051	0,132	78,04
	RSR	2,216	0,005	0,127	490,96

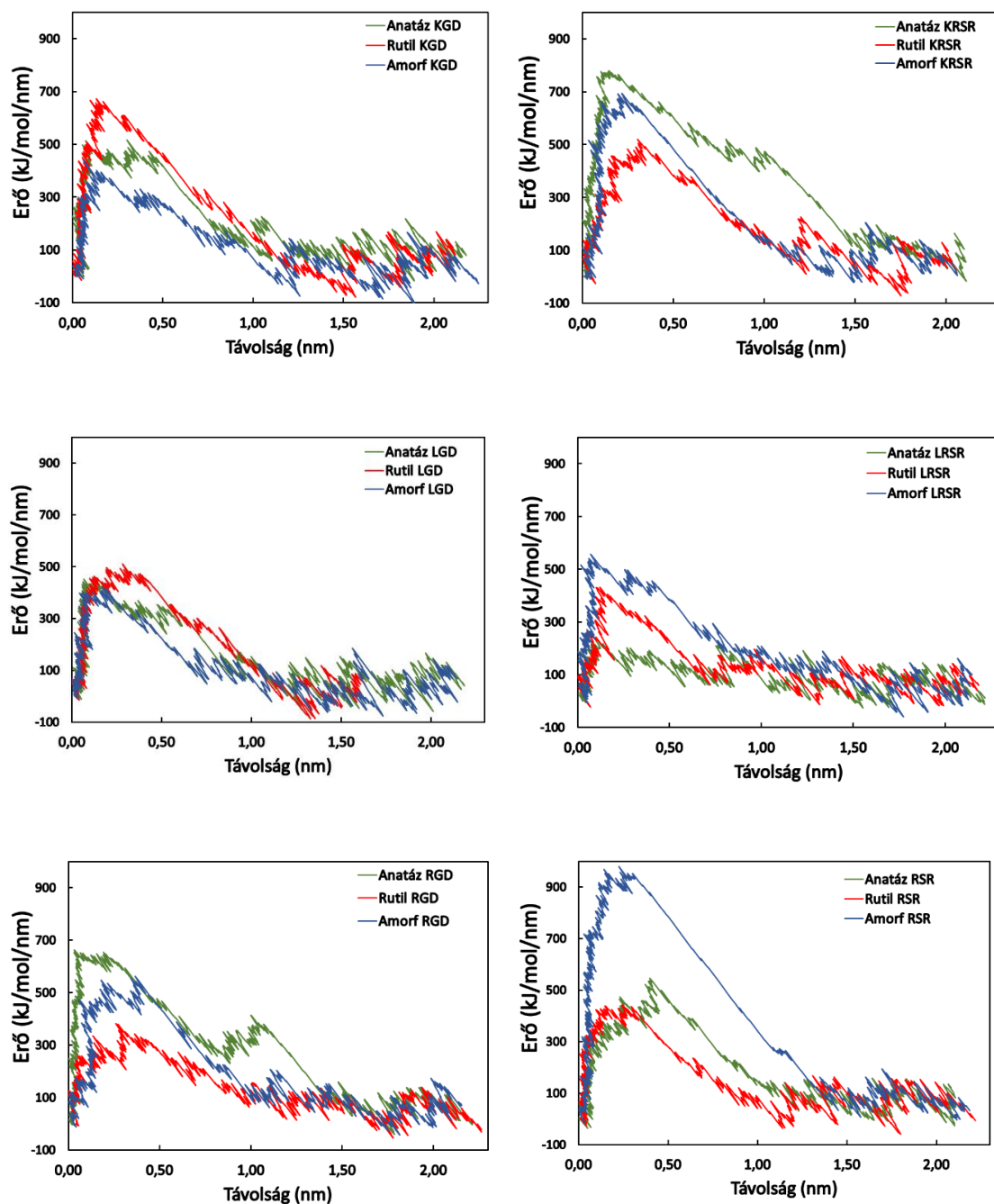
1. táblázat: A három TiO₂ felülethez tapadó peptidek átlagos RMSD értékei (a szórás feltüntetésével) a kezdeti időpillanathoz képest, valamint a teljes szimuláció során kapott minimális távolság a felület és a peptid között, és a hozzá tartozó szimulációs időpont.

A konformáció variabilitást a peptidek RMSD értékeivel jellemeztem, mivel az RMSD az atomi koordináta értékeinek változását jellemzi. Az RMSD értékeket és azok szórásait az 1. táblázatban tüntettem fel. A peptidek RMSD értéke 0,2 – 0,3 nm között mozog, ami egy aránylag kis változást jelent az egyensúlyi állapotból kiinduló geometriához képest. Ez alól kivételt képez az RSR az amorf felületen, ahol az RMSD $2,216 \pm 0,005$ nm, a nagy átlagos érték és kicsi szórás arra utal, hogy ez a változás már rögtön a szimulációs idő kezdetén megtörtént. Az RSR „megtalálta” az egyensúlyi állapotát és a továbbiakban ettől kevéssé tért el.

A peptidek a háromfajta TiO_2 felülethez tartozó kötési energiáit elhúzási szimulációk segítségével határoztam meg. Az elhúzási szimulációhoz a rendszerek kezdeti állapotait az 500 ns szimulációs idő során megjelenő állapotok közül választottam ki. A kiválasztás kritériuma az volt, hogy az adott peptid a TiO_2 felülethez képest a lehető legközelebb legyen. A meghatározott minimális távolság értékek és a hozzá tartozó szimulációs időpontok az 1. táblázatban találhatók. A minimális távolságok a különböző peptidek esetében mind a három TiO_2 felületen hasonló értékűek voltak, 0,12 és 0,22 nm közötti értékeknek adódtak. Ez megfelel a felülethez való közvetlen kötődés esetén a kémiai kötés távolságának.

A kezdeti állapot kijelölése után egy 500 ps-nyi NPT egyensúlyi állapot keresést valósítottam meg, ahol a peptidlánc atomjaira előírtam egy $1000 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{nm}^2}$ rugóállandóval jellemezhető harmonikus kényszert a kiindulási pozíciójukhoz képest. Ezután történt az elhúzási szimuláció, ahol a felületekre merőleges tengely mentén történt az elhúzás (ebben az esetben ez az x tengely volt). Egy új, szintén $D = 1000 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{nm}^2}$ rugóállandójú harmonikus potenciál segítségével a peptidek tömegközéppontjára vonatkozó 10 nm/ns elhúzási sebességet határoztam meg. A 44. ábra mutatja az elhúzási görbéket, ahol a kifejtett erőt láthatjuk a távolság függvényében. Az erő-távolság görbék lefutása hasonló a különböző peptidekre nézve a különböző felületeken. Egy meredek felfutás látható, ahol az erő közel lineráisan növekszik viszonylag kis távolság alatt. Ez arra utal, hogy a peptidek a TiO_2 felületek közelében maradtak mindaddig, amíg az erő érték el nem ért egy kritikus határt. Ekkor szakadnak el a peptidek a felülettől és távolodnak el fokozatosan, az erő értéke pedig egyre csökken, ahogy távolodnak a felülettől. Megfigyelhetők kis oszcillációk a görbéken, amik a peptidek és a vízmolekulák közötti

kölcsönhatásból adódnak. A felülettől 1 – 1,5 nm-re már csak ebből a kölcsönhatásból adódik járulékos hatás, a felület hatásai elhanyagolhatóak. A számolt görbék hasonlóak, de a karakterisztikus értékek különbözőek.



44. ábra: Az elhúzás során a molekula tömegközéppontjára ható az erő a távolság függvényében.

Két értéket határoztam meg a görbék alapján; ezek a maximális erő és a görbe alatti terület. Az erő-távolság grafikonok esetén a görbe alatti terület egy energia dimenziójú

menyiség, amit kötési energiának neveztem el és a továbbiakban ezen mennyiségeket hasonlítottam össze.

A 44. ábrán látható görbék kiértékelése során kapott adatokat a 2. táblázat tartalmazza.

Felület	Peptid	Maximum erő az elhúzás során	Kötési energia	Kötési energia
		$\left[\frac{kJ}{mol \cdot nm} \right]$	$\left[\frac{kJ}{mol} \right]$	[eV]
Anatáz	KGD	516,3	335,4	3,5
	KRSR	779,7	690,6	<u>7,2</u>
	LGD	453,0	276,7	2,9
	LRSR	238,4	124,9	1,3
	RGD	662,7	559,3	<u>5,8</u>
	RSR	546,1	346,5	3,6
Rutil	KGD	672,9	415,9	4,3
	KRSR	519,3	330,4	3,4
	LGD	510,3	329,0	3,4
	LRSR	431,6	165,1	1,7
	RGD	382,0	238,1	2,5
	RSR	443,0	255,3	2,7
Amorf	KGD	442,9	225,6	2,3
	KRSR	694,0	419,3	4,6
	LGD	424,6	182,1	1,9
	LRSR	556,7	395,6	4,1
	RGD	562,8	337,0	3,5
	RSR	979,0	754,0	<u>7,8</u>

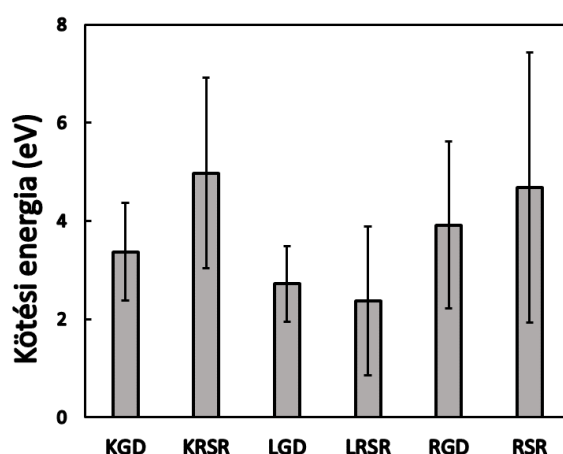
2. táblázat: Anatáz, rutil és amorf TiO₂ felületen a peptidek elhúzásához szükséges maximális erők és az elhúzás távolság görbe alapján számolt kötési energiák. A legmagasabb három kötési energiát aláhúzással jelöltem.

A táblázatban az anatáz, rutil és amorf TiO₂ felületekről a hat vizsgált peptid elhúzási szimulációja során meghatározott, az elszakadáshoz szükséges maximális erők és az elhúzás távolság görbe alapján számolt kötési energiák szerepelnek. A kötési energiát két mértékegység szerint is megadtam. A nemzetközi irodalomban szokásos a kJ/mol egység használata, az atom- és molekulafizikában azonban az eV értékek adnak olyan számértékeket, amelyek fizikai értelmezése kézenfekvőbb.

Az összes esetet tekintve az átlagos maximális erő érték és szórása $545,3 \pm 167,37 \frac{kJ}{mol \cdot nm}$. A maximális elhúzási erő szempontjából a legkisebb átlagos erő értéket

a három felületre vonatkozóan az LRSR-nél kaptam: $408,9 \pm 160,36 \frac{kJ}{mol \cdot nm}$. A KRSR és RGD esetén jóval nagyobb értékeket kaptam, átlagban $664,3 \pm 132,7 \frac{kJ}{mol \cdot nm}$ és $535,8 \pm 142,28 \frac{kJ}{mol \cdot nm}$. A maximális erő szempontjából látványosan kitűnik az RSR peptidnek az amorf felületre meghatározott $979 \frac{kJ}{mol \cdot nm}$ értéke. A legnagyobb maximális erőérték átlagot is az RSR esetén kaptam: $656 \pm 284,4 \frac{kJ}{mol \cdot nm}$. Érdeemes megjegyezni, hogy az $1 \frac{kJ}{mol \cdot nm}$ érték a szokásos N egységben kifejezve 1,661 pN értéket ad, amiből jobban érzékelhető, hogy az egy-egy molekula kötési erői rendkívül kicsik.

A kötési energiákat kiátlagolva is meghatároztam a három TiO₂ felület típusra, amit 45.ábra mutat.

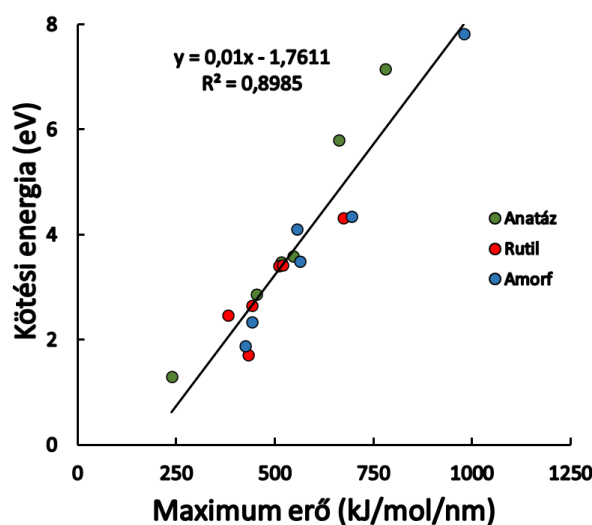


45. ábra: A három modellezett felületre átlagolt kötési energiák értékei eV egységekben.

Az értékek szórását a hibasáv jeleníti meg.

A legalacsonyabb kötési energiákat az N-terminális végükön Leu (L) aminosavat tartalmazó peptidek esetén kaptam, LGD esetén $2,72 \pm 0,77$ eV, az LRSR esetén pedig $2,37 \pm 1,51$ eV. A legnagyobb átlagos értéket a KRSR esetén kaptam $4,98 \pm 1,94$ eV.

A 46. ábra mutatja a három különböző TiO₂ felületre és a hat vizsgált molekulára kapott eredmények összesítését: a maximális erő értékek függvényében ábrázoltam a kötési energiákat. Az ábrán az anatóz és amorf TiO₂ esetében található pár kiugróan magas kötési energia-maximális erő érték (Ezek a 2. táblázatban aláhúzással jelölt KRSR, RGD és RSR molekulákra vonatkozó értékek). A rutil felület esetén egy szűkebb tartományba esnek az eredmények.



46. ábra: Az elhúzás szimuláció során kapott adatok alapján meghatározott maximális erő – kötési energia grafikon. Az adatok közti lineáris összefüggést a lineáris regresszió jól mutatja.

A kötési energia és maximális elhúzási erő között lineáris összefüggést találtam, a determinációs együttható $R^2 = 0,8985$. A maximális felülettől való elszakítási erő növekedésével a kötési energia is növekedett, az összefüggés, amelyet kaptam:

$$E_{köt} = 0,01 \cdot F_{max} + 1,7611 . \quad (27)$$

A DFT módszerekkel meghatározott TiO_2 peptid és aminosav kötési energiák szintén a néhány eV nagyságrendbe esnek. Sowmiya korábban DFT módszerrel meghatározta az RGD tripeptid kötési energiáját anatáz (001) felületen különböző molekula állapotokban [64]. A legnagyobb értéket $\sim 1,6$ eV-nak számították, a legalacsonyabb 0,06 eV volt, ezen értékek persze függenek a választott kicserélődési és korrelációs funkcionáltól is. Muir és munkatársai szintén DFT számolásokat végeztek az RGD peptiddel rutil (110) TiO_2 felületen [68]. A karboxilcsoporton keresztüli tapadást vizsgálták, a számított adszorpciós energiák a 0,5–0,77 eV között mozogtak, a disszociációs kölcsönhatási energia pedig 9,04 és 10,65 eV-nak adódott.

A DFT módszerek az elektronszerkezetet és a molekulák konformációit kvantummechanikai alapelvek alkalmazásával határozzák meg. Az általam végzett elhúzási MD szimulációk kötési energia eredményei nagyságrendileg megegyeznek az irodalmi DFT módszerekkel meghatározott kötési energia értékekkel. Ez azt jelzi, hogy a MD szimulációkban használt erők megfelelően írják le a felület – molekula – vizes

fázis kölcsönhatásokat. Az általam meghatározott kötési energia értékek jól korreláltathatók az előző alfejezetben meghatározott kötési időhányad értékekhez. Ez el is várható, hiszen az elhúzási MD szimulációkat ugyanazokon a rendszereken végeztem el. Az általam meghatározott kötési energia értékek egy egyszerű számolásból adódnak, ami lehetővé teszi azt, hogy a különböző peptidek, különböző felületeken való megtapadását összehasonlíthassuk. A 45. ábrán látható eredményeim alapján megerősíthető az a megfigyelés, hogy az N-terminális végén Leu aminosavat tartalmazó peptidek gyengébben kötődnek a TiO_2 felületekhez. Az *in vitro* kísérleteket leíró irodalomból ismert, hogy az RGD és a KRSR segíti a sejttapadást, és ez korrelál az én eredményeimmel. A számításaim alapján érdemes esetleg az RSR tripeptidet is ajánlani a kísérleti vizsgálatokhoz. A 46. ábrán mutatott eredmények szerint a rutil felületen a különböző peptidek kötési energiái hasonlóak, míg az anatáz és amorf felületeken nagyobb tartományba esnek; e két felület esetében kaptam a legnagyobb kötési energia értékeket is (anatázon KRSR, amorf felületen RSR).

A molekulakötődést leíró pontosabb, statisztikai kiértékeléssel alátámasztott adatok eléréséhez több MD szimuláció elvégzésére lenne szükség. Várhatóan a szuperszámítógépek számítási kapacitásának növekedésével, illetve a kvantumszámítógépek megjelenésével nagyobb számú szimuláció elvégzése válik majd lehetővé, és komplexebb, a valósághoz közelebbi rendszerek (például a vér-szérumnak megfelelő összetételű környezetben implantátum felületek) vizsgálata is lehetővé válik.

6 Magyar nyelvű összefoglalás és tézisek

A disszertációmban azt elemeztem, hogy a vizsgálataimba bevont három és négy aminosavból álló rövid peptidek a különböző TiO_2 felületeken hogyan tapadnak meg víz jelenlétében és milyen kölcsönhatások lépnek fel e folyamat során molekuláris szinten.

Elsősorban az irodalomban eddig MD szimulációkkal nem vizsgált KRSR peptiddel végeztem szimulációkat. A KRSR peptid anatóz módosulatú TiO_2 felületre való tapadását a hagyományos MD szimuláció mellett, REMD, valamint elhúzási és umbrella sampling módszerrel számolt PMF görbe segítségével tanulmányoztam. A CHARMM36 és az általam definiált TiO_2 erőter, valamint a választott MD paraméterek lehetővé tették, hogy az általam létrehozott TiO_2 és KRSR modellrendszer vizes fázisban egyensúlyi állapotba kerüljön. A klasszikus 200 ns MD szimuláció során a KRSR peptid a vizes fázisból az anatóz TiO_2 felülethez vándorolt, és megtapadt azon. Először egy vízmolekulák által meghatározott kötési távolságba került, majd néhány ns után szorosan odatapadt a felülethez $0,148 \pm 0,007$ nm távolságban. A KRSR anatóz felületen való tapadásban fontos szerepet játszottak a töltött oldalláncok és a peptid N- és C-terminális aminosavai.

A 200 ns-os szimuláció legutolsó időpillanatához tartozó állapotán ezután REMD szimulációt végeztem. Ezt megelőzően a hőmérséklet különbséget az egyes szimulációs szálak között egy rövid felfűtési és egyensúlyi állapot kereséssel állítottam be $\Delta T = 1,5$ K értékre. Így a kicserélési valószínűség a REMD során $\sim 0,3$ értékűnek adódott. A REMD vizsgálattal 96 különböző hőmérsékletű szálon 50 ns időtartamú szimuláció segítségével feltérképeztem a lehetséges molekula konformációkat a legalacsonyabb hőmérsékleti szimulációs szálon, azaz a legkisebb potenciális energiával rendelkező állapotokat. E molekula konformációk között volt egy kiemelkedő állapot, amely a KRSR molekulára a szimulációs idő 40%-ában volt jellemző, 4751-es klaszter mérettel 0,1 nm RMSD levágás esetén.

Ezután elhúzási szimulációt végeztem ezzel a KRSR konformációs állapottal. Az anatóz TiO_2 felületre merőleges tengely mentén elhúztam a KRSR peptidet 5 nm-re, 5 nm/ns sebességgel. A kapott maximális elhúzási erő $\sim 400 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{nm}}$ értékre nőtt 0,2 ns-nál, amikor a peptid elszakadt a felülettől. Az elszakadás után az erő fokozatosan csökkent, ahogy a vizes fázisba húztam a KRSR peptidet. Az elhúzási adatsort 10 ns

umbrella sampling módszerrel mintavételeztem 24 különböző pontban. A mintavételezés során a tömegközéppontot az adott pontban harmonikus potenciállal rögzítettem. A 24 pontot az elhúzási adatsorból kaptam meg, a felülettől távolodva egységes távolságokat kijelölve. Az eredmény adatsort WHAM algoritmussal analizálva meghatároztam a KRSR molekulára ható átlagos erőből a potenciált. A potenciál – távolság értékekből felrajzoltam a PMF görbét. A kötési szabadentalpiát a PMF görbéből határoztam meg. A KRSR molekulára az anatóz felületen $\Delta G = 8,817 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ kötési szabadentalpia értéket kaptam.

A KRSR peptid mellett az RGD és további KGD, LGD, LRSR, RSR módosított változatokkal végeztem MD szimulációkat az általam létrehozott anatóz és rutil kristályos, valamint amorf TiO_2 felületeken. Az amorf TiO_2 struktúrát az anatóz 3000 K hőmérsékletre való felfűtésével majd hirtelen 310 K-re való lehűtésével kaptam egy periodikus határral rendelkező szimulációs dobozban. A hat különböző peptiddel a háromfajta TiO_2 felületen külön-külön 500 ns MD szimulációt végeztem 2 fs időlépésközzel 310 K hőmérsékleten. Meghatároztam a peptidek TiO_2 felületektől 0,5 nm-re töltött időarányát a teljes szimulációs időhöz képest és összehasonlítottam ezen értékeket. A KRSR, RGD és RSR peptidek kiemelkedően magas időarány értéket értek el (sorrendnek megfelelően átlagosan 82,93 %, 87,26 % és 69,78 %) azaz a TiO_2 felületen megtapadtak és annak közelében tudtak maradni a szimuláció során. A LRSR, amely nem tartalmaz az első aminosav részben töltött részt, ezzel ellentétben rendkívül alacsony, átlagosan 31,72 % adszorpciós időaránnyal rendelkezett.

A hat peptiddel a három TiO_2 felülettől elhúzási szimulációt végeztem, amelynél a peptidek tömegközéppontjára egy $1000 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{nm}}$ rugóállandójú harmonikus potenciállal hatva elhúztam a peptideket a felületre merőleges tengely mentén 10 nm/ns sebességgel. Ezen elhúzási szimulációk kezdeti állapotaihoz az előzőekben tárgyalt 500 ns szimuláció során a TiO_2 felületekhez legközelebbi állapotokat választottam ki. Az elhúzási adatsor eredményeül kapott kifejtett erő – távolság grafikonokat elemezve meghatároztam a maximálisan kifejtett erőt és kiszámítottam a görbe alatti területet, amely egyfajta kötési energia értéket ad. A legnagyobb kötési energiákat a három felületre átlagosan a KRSR (4,98 eV), RGD (3,92 eV) és RSR (4,68 eV) esetén kaptam, a legkisebbet az LRSR

(2,37 eV) esetén, ami az adszorpciós időarányának is megfelelő sorrend. A maximális elhúzási erő és a kötési energia között lineáris összefüggést találtam

Ezek a szimulációk lehetővé tették, hogy atomi szinten tudjam modellezni különböző peptidek adhézíós folyamatait a TiO_2 felületeken. Az általam modellezett kölcsönhatások dinamikájának megértése kulcsfontosságú lehet a TiO_2 alapú implantátumok és protézisek fejlesztésében. A peptidek és a TiO_2 felületek közötti kölcsönhatások megértése lehetőséget ad bioaktív felületek kialakítására, ezáltal a biokompatibilitás javítására és a távolabbi jövőben sejt-implantátum felület kölcsönhatások hatékonyabb irányítására az orvosi implantációs eljárások során.

Tézisek

Tézis 1. Molekula dinamikai szimulációt végeztem vizes környezetben a KRSR (Lys-Arg-Ser-Arg) peptid anatóz titán-dioxid felülettel történő kölcsönhatásának vizsgálatára céljából. Megállapítottam, hogy 200 ns szimuláció alatt a KRSR molekula a vizes fázisból indulva, megtapad a titán-dioxid felületen és stabilan megkötődik. A kötődés folyamatait három fázisra osztottam. Az első fázis során 1,5 ns alatt a KRSR peptid 0,3 nm-re közelítette meg a felületet (migráció), majd a második fázis során ezt a távolságot tartotta 6 ns-ig. A harmadik fázis során egy szorosabb letapadás alakul ki, a KRSR peptid és a legközelebbi felszíni atom távolsága a szimuláció utolsó 193 ns-ban $0,148 \pm 0,008$ nm-re állt be. Továbbá, ezen szimulációs eredményekkel megmutattam, hogy a KRSR molekula adhézíójában fontos szerepet játszik a peptid N-terminális végén lévő pozitívan töltött lizin (K, Lys), ami a töltött aminocsoportjával tapad meg az anatóz felületen [T1].

Tézis 2. Meghatároztam a KRSR tetrapeptid molekula konformációit az anatóz titán-dioxid felületen REMD (Replica Exchange Molecular Dynamics) módszerrel. A konformációk meghatározásakor figyelembe vettem a vizes környezet hatásait. A REMD szimuláció, amelyet ennek céljából végeztem 96 különböző hőmérsékletű 310 K – 454 K, 50 ns párhuzamosan futó szimulációból állt. Ezzel meghatároztam a KRSR molekula konformációs sokaságait a titán-dioxid felületén a REMD szimulációban szereplő hőmérsékleteken. A 310 K-re jellemző különböző molekula konformációkat 0,1 nm

RMSD LINCS klaszterezéssel különítettem el. Ezen klaszterek közül kiválasztottam a legnagyobb populációjút, ami Boltzmann-eloszlást feltételezve a legalacsonyabb energiájú is, amelyhez 4751 szerkezet tartozik. A legalacsonyabb hőmérsékletű (310 K) replika esetén a molekula ezen szerkezetek valamelyikét veszi fel a teljes szimulációs idő mintegy 40%-ban [T1].

Tézis 3. A REMD módszerrel kapott domináns KRSR klaszter reprezentáns állapottal az anataz titán-dioxid felületen húzási szimulációt végeztem, amellyel meghatároztam a kötési szabadentalpiát vizes fázis figyelembevételével. A húzási szimuláció során a felületre merőleges tengely mentén történt a molekula elhúzása. A kiértékeléshez 24 pontban végeztem 10 ns hosszú mintavételezést (240 ns teljes szimulációs idő) az umbrella sampling módszerrel, amelyhez a húzás során kapott KRSR molekula állapotokat választottam ki egyenletesen elosztott távolságokra a TiO_2 felülettől, a legkisebb távolság 0,156 nm, a legnagyobb 2,77 nm. A mintavételezés során kapott görbéken súlyozott hisztogram elemzést végeztem (WHAM algoritmus), amely segítségével kapott PMF (Potential of Mean Force) görbe alapján meghatároztam a kötési szabadentalpiát, ami $\Delta G = 8,817 \text{ kcal/mol}$ (azaz 0,3823 eV) [T1].

Tézis 4. Összehasonlítottam hat kis méretű peptid adszorpcióját különböző titán-dioxid felületeken vizes környezetben. Az összehasonlítást a KGD, KRSR, LGD, LRSR, RGD, RSR peptidekre végeztem az anataz, rutil és amorf TiO_2 felületeken. Az adszorpció jellemzésére a kötődési időarányt használtam, ami a peptidnek a TiO_2 felület közelében töltött idejének (távolság $< 0,5 \text{ nm}$) és a teljes szimulációs időnek hányadosaként határoztam meg. Az eredmények alapján azonosítottam azokat a peptideket, melyek kiemelkedő kötődési tulajdonságokat mutatnak az egyes felületeken. A kötési időarány szempontjából a KRSR és RGD magas értékeket mutattak mind a három felület típuson, átlagosan $82,93 \pm 1,13\%$ és $87,26 \pm 10,11\%$ volt az adszorpciós időarányuk. Az LGD és RSR értéke kissé elmarad ezekhez képest: $77,99 \pm 14,7\%$ és $69,79 \pm 18,2\%$. A KGD szintén magas, $80,31 \pm 14,43\%$ átlag értéket mutatott, az adszorpciós időaránya az amorf TiO_2 felületen kiemelkedően nagy volt $91,26\%$. Az LRSR adszorpciós időaránya a többi peptidhez képest jóval alacsonyabbnak adódott: $31,72 \pm 16,34\%$. Megállapítottam, hogy

azok a peptidek tudtak hosszabb ideig megtapadni, amelyek N-terminális aminosava a pozitív töltéssel rendelkező lizin (K) vagy arginin (R), míg ha ezeket a töltéssel nem rendelkező leucinnal (L) helyettesítjük, a kötési időarány csökkenése figyelhető meg [T2].

Tézis 5. A választott peptidek (KGD, KRSR, LGD, LRSR, RGD, RSR) különböző TiO_2 felületekre (anatáz, rutil és amorf) történő tapadásának kötési energiáit elhúzás szimulációk segítségével határoztam meg. A számolt kötési energiák néhány eV nagyságrendbe esnek. A legalacsonyabb kötési energiákat az N-terminális leucinnal (L) kezdődő peptidek esetén kaptam, LGD esetén $2,72 \pm 0,77$ eV, az LRSR esetén pedig $2,37 \pm 1,51$ eV. A legnagyobb átlagos értéket a KRSR esetén kaptam $4,98 \pm 1,94$ eV. A maximális elhúzási erő és kötési energia között lineáris összefüggést találtam [T2].

7 Angol nyelvű összefoglalás és tézisek

In my dissertation, I investigated the adsorption behavior of short peptides composed of different three and four amino acids on various TiO_2 surfaces in an aqueous environment, and the molecular interactions involved between the surface and the biomolecules.

In my research simulations were performed using the KRSR peptide, which has not been previously investigated with MD simulations in the literature. In this work the molecular adsorption of the KRSR peptide was studied on a model of anatase TiO_2 surface using conventional MD simulations, REMD, pulling, and umbrella sampling methods to examine the PMF curve. For this purpose, the CHARMM36 force field was used, and the TiO_2 force field parameters were defined by me. These, along with the chosen MD parameters, enabled to achieve the equilibrium state of the TiO_2 -KRSR model system created by me in an aqueous phase. A classical 200 ns MD simulation was conducted where the KRSR peptide diffused from the water phase and adhered to the anatase TiO_2 surface. Initially, it approached the surface within a bonding distance defined by water molecules, and after a few ns, it tightly adsorbed to the surface at a distance of 0.148 ± 0.007 nm. The adhesion of KRSR to the anatase surface was significantly influenced by the charged side chains and the N- and C-terminal of the peptide.

REMD simulations were performed with the molecular state corresponding to the final 200 ns MD simulation time point. Altogether 96 simulation threads were applied with 10 ns simulation time with different temperatures. The possible molecular conformations of the lowest temperature replica were explored, which corresponds to the states with the lowest potential energy. For this purpose, the temperature difference between individual simulation replicas was adjusted to $\Delta T = 1.5$ K through a short heating and NPT equilibration search. As a result, the exchange probability during REMD was approximately ~ 0.3 . Among these molecular conformations, there was a prominent state that accounted for 40% of the simulation time of this replica, with a cluster size of 4751 at 0.1 nm RMSD cutoff.

A pulling MD simulation was performed using the obtained dominant KRSR molecular conformational state on the lowest REMD replica. The KRSR peptide was

pulled along the axis perpendicular to the anatase TiO₂ surface to a distance of 5 nm, at a pulling rate of 5 nm/ns. During the pulling simulation the resulting maximum pulling force increased to $\sim 400 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{nm}}$, and at 0.2 ns, at this point the KRSR peptide detached from the TiO₂ surface. After the detachment, the force gradually decreased as the KRSR peptide was pulled back into the water phase. The pulling trajectory was sampled using the umbrella sampling method at 24 different points over 10 ns MD simulation with restrictions of the peptide movement. During the sampling, the center of mass was harmonically restrained at each point. The 24 sampling points were chosen at uniform distances as the KRSR molecule were pulled away from the surface. The obtained data were analyzed using the WHAM algorithm to derive the PMF from the average force acting on the KRSR molecule. The PMF curve was plotted based on the potential - distance values. The binding free energy was determined from the PMF curve which was given the value of $\Delta G = 8.817 \text{ kcal/mol}$ for the KRSR molecule on the anatase surface.

In addition to the KRSR peptide, MD simulations were also performed with the RGD and their modified versions KGD, LGD, LRSR, and RSR peptides, both on the anatase, rutile crystalline, and amorphous TiO₂ surfaces. The amorphous TiO₂ structure was created by heating the anatase structure to 3000 K and then rapidly cooling it to 310 K in a simulation box with periodic boundaries. For each of the six different peptides, separate 500 ns MD simulations were performed at 310 K, with a time step of 2 fs, on each of the three types of TiO₂ surfaces. From the MD trajectories the ratio of the simulation time the peptides spent within 0.5 nm from the TiO₂ surfaces were collected and the ratio was calculated to the total simulation time, and these values were compared. The KRSR, RGD, and RSR peptides exhibited remarkably high adsorption time ratio (with a mean value of 82.93%, 87.26%, and 69.78%, respectively), indicating that they strongly adsorbed onto the TiO₂ surfaces and remained in their vicinity throughout the simulations. In contrast, the LRSR peptide, which does not have a charged N-terminal amino acid residue, showed an extremely low average adsorption time percentage of 31.72%.

Pulling simulations were also performed with the six peptides from the three TiO₂ surfaces, in which the peptides were pulled along the axis perpendicular to the surface. The pulling rate was set to 10 nm/ns, using a harmonic potential with a spring constant of 1000 kJ/(mol·nm), that was applied to the center of mass of the peptides. The initial states

for these pulling simulations were selected from the states closest to the TiO₂ surfaces during the 500 ns MD simulations. By analyzing the force-distance graphs from the pulling simulations, the maximum applied force was determined, and the areas under the curve was also calculated, that is providing a measure of the binding energy. The highest binding energies were obtained on the three surfaces, with averages of 4.98 eV for KRSR, 3.92 eV for RGD, and 4.68 eV for RSR, while the lowest was obtained for LRSR with 2.37 eV, which corresponds to the order of the adsorption time percentages. Furthermore, a linear relationship between the maximum pulling force and the binding energy were found.

These simulations enabled me to model the adhesion processes of various peptides on the TiO₂ surfaces at the atomic level. Understanding the dynamics of the interactions I modeled is of crucial importance for the development of TiO₂-based implants and prostheses. The comprehension of interactions between such peptides and TiO₂ surfaces opens up possibilities for designing bioactive surfaces, thereby improving biocompatibility, and in the future, more efficiently directing cell-implant surface interactions during medical implantation procedures.

Theses

Thesis 1. I performed molecular dynamics simulations in an aqueous environment to investigate the interaction between the KRSR (Lys-Arg-Ser-Arg) peptide and the anatase TiO₂ surface. The KRSR peptide starting from the water phase have adsorbed to the TiO₂ surface during a 200 ns MD simulation. I observed that the binding of the KRSR molecule to the TiO₂ surface can be divided into three phases. During the first phase, within 1.5 ns, the KRSR peptide is diffusing in the water phase and approaches the surface by 0.3 nm (migration), and then in the second phase it maintains this distance for the following 6 ns. In the third phase, a tighter adhesion was established, with the distance between the KRSR peptide and the nearest surface atom settling at 0.148 ± 0.008 nm during the last 193 ns of the simulation. Furthermore, these simulation results highlighted the significance of the charged amino acid residue K (Lys, located at the N-terminus of the peptide) in the adhesion of the KRSR molecule, as it adheres to the anatase surface through its charged amino group [T1].

Thesis 2. I determined the molecular conformations of the KRSR tetrapeptide on the anatase TiO₂ surface using REMD (Replica Exchange Molecular Dynamics) method in an aqueous environment. The REMD simulation performed for this purpose consisted of 96 parallel replicas, ranging from 310 K to 454 K temperatures, each lasting 50 ns. This approach allowed me to identify the molecular conformation states of the KRSR molecule on the TiO₂ surfaces on the given temperature. Various molecular conformations were explored through a 0.1 nm RMSD LINCS clustering. Among these clusters, I selected the one with the greatest population, which assuming Boltzmann distribution, also has the lowest energy, the cluster size of this conformation was 4751. The KRSR molecule was present in this state approximately 40% of the simulation time at the lowest temperature (310 K) [T1].

Thesis 3. Using the dominant conformation of the KRSR peptide obtained through the REMD method on the anatase TiO₂ surface, I conducted a pull simulation to determine the binding free energy in the aqueous environment. During the pull simulation the KRSR peptide center of mass was pulled along the axis perpendicular to the surface. To further evaluate the binding energy, I performed umbrella sampling at 24 points over a 10 ns period (240 ns total simulation time), where I selected KRSR peptide states from the pull process at uniform distances from the TiO₂ surface, the smallest distance was 0.156 nm, the largest was 2.77 nm. Using the curves obtained during the sampling, I determined the free binding energy based on the potential of mean force (PMF) curve using weighted histogram analysis (the WHAM algorithm). The resulting value for the binding free energy was $\Delta G = 8.817 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ (equivalent to 0.3823 eV) [T1].

Thesis 4. I determined the adsorption time ratios of six small-sized peptides on various TiO₂ surfaces in an aqueous environment. The comparison was conducted for the peptides KGD, KRSR, LGD, LRSR, RGD, and RSR on the anatase, rutile, and amorphous TiO₂ surfaces. The adsorption time ratio was calculated as the proportion of simulation time spent interacting with the TiO₂ surface (distance < 0.5 nm) compared to the total simulation time. Based on the results, I identified peptides that exhibited

outstanding binding characteristics on different surface types. In terms of the adsorption time ratio, KRSR and RGD demonstrated high values across all the three surface types, averaging $82.93 \pm 1.13\%$ and $87.26 \pm 10.11\%$, respectively. LGD and RSR values lagged slightly behind, with values of $77.99 \pm 14.7\%$ and $69.79 \pm 18.2\%$ respectively. KGD also showed a high average value of $80.31 \pm 14.43\%$, with exceptionally elevated adsorption residence time ratio of 91.26% on the amorphous TiO₂ surface. Conversely, LRSR exhibited a substantially lower adsorption time ratio compared to the other peptides: $31.72 \pm 16.34\%$. It was observed that peptides carrying positively charged amino acids, Lys (K) and Arg (R) at their N-termini demonstrated prolonged adhesion. Conversely, peptides with a non-charged N-terminal amino acid, Leu (L) resulted a decrease in their adsorption time ratio [T2].

Thesis 5. I determined the binding energies of the selected peptides (KGD, KRSR, LGD, LRSR, RGD, and RSR) adhering to different TiO₂ surfaces (anatase, rutile, and amorphous) using pulling simulations. The calculated binding energies are in the order of a few eV. The lowest binding energies were obtained for peptides starting with N-terminal Leu (L); 2.72 ± 0.77 eV in case of LGD and 2.37 ± 1.51 eV in case of LRSR averaged for the three surface types. The highest average value was observed for KRSR at 4.98 ± 1.94 eV. Furthermore, a linear relationship was found between the maximum pulling force and the calculated binding energies [T2].

8 Saját publikációk

Tézispontokhoz kötődő publikációk

[T1] Tarjányi, T.; Bogár, F.; Minarovits, J.; Gajdács, M.; Tóth, Z. Interaction of KRSR Peptide with Titanium Dioxide Anatase (100) Surface: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Int. J. Mol. Sci* **2021**, *22*, 13251.

[T2] Tarjányi, T.; Bogár, F.; Minárovits, J.; Gajdács, M.; Tóth, Z.; Interaction of biomolecules with anatase, rutile and amorphous TiO₂ surfaces: A molecular dynamics study. *PLOS ONE* **2023**, *18*, e0289467.

Egyéb publikációk

[S1] Körtvélyessy, G.; Tarjányi, T.; Baráth, Z. L.; Minarovits, J.; Tóth, Z. Bioactive Coatings for Dental Implants: A Review of Alternative Strategies to Prevent Peri-Implantitis Induced by Anaerobic Bacteria. *Anaerobe*, **2021**, *70*, 102404. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2021.102404.

[S2] Körtvélyessy, G.; Szabó, Á. L.; Pelsőczy-Kovács, I.; Tarjányi, T.; Tóth, Z.; Kárpáti, K.; Matusovits, D.; Hangyási, B. D.; Baráth, Z. Different Conical Angle Connection of Implant and Abutment Behavior: A Static and Dynamic Load Test and Finite Element Analysis Study. *Materials*, **2023**, *16*, 1988. DOI: 10.3390/ma16051988.

9 Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmenk dr. Tóth Zsolt szakmai útmutatását és irányítását. Nagyra értékelem, hogy mindig rendelkezésemre állt, ha szükség volt rá. Köszönöm a gyakran késő estékbe és hétvégékbe nyúló konzultációkat és beszélgetéseket, melyek szakmai fejlődésemet megalapozták.

Köszönöm dr. Bogár Ferenc a szakmai jótanácsait és útmutatását. Az ő segítségével tanultam meg a molekuladinamikai szimulációs módszerek alapjait és a szuperszámítógépes infrastruktúra használatát.

Köszönöm Professzor dr. Minárovits János segítségét és jó tanácsait a cikkek és a disszertáció megírásában. A szakmai útmutatása és a tudományhoz való alázata példaértékű számomra. Hatalmas tudása és szakértelme nagyban segítette munkámat, nagy örömömmre szolgál, hogy vele együtt dolgozhatok.

Köszönöm dr. Turzó Kinga iránymutatását és segítségét, a szakmai utam elindításában különösen fontos szerepet játszott. Megalapozta és megteremtette a lehetőségét, hogy a Szegedi Tudományegyetem Fogorvostudományi Karán elindulhassanak szuperszámítógépes kutatásaink.

Köszönöm dr. Gajdács Máriónak a rengeteg segítséget és tanácsot, amelyet a cikkek írásakor nyújtott.

Köszönöm a családomnak és különösképp feleségemnek a türelmüket és támogatásukat, nélkülük a doktori értekezésem nem születhetett volna meg.

A munka egy része a GINOP-2.3.2-15-2016-00011 pályázat keretein belül valósult meg, köszönöm a támogatást.

Köszönöm továbbá a KIFÜ-nek a szükséges számítástechnikai kapacitás rendelkezésemre bocsájtását a Debrecen2 (Leo) szuperszámítógépen a „Fogászati implantátum felületek és polipeptidek kölcsönhatásának molekuladinamikai és kvantumkémai modellezése” című (fimplant) projekt keretében

10 Irodalomjegyzék

1. Kruyt, I. J.; Nelissen, R. C.; Mylanus, E. A. M.; Hol, M. K. S. Three-Year Outcomes of a Randomized Controlled Trial Comparing a 4.5-Mm-Wide to a 3.75-Mm-Wide Titanium Implant for Bone Conduction Hearing. *Otology & Neurotology*, **2018**, 39, 609–615. DOI: 10.1097/mao.0000000000001761.
2. Li, L.-H.; Kong, Y.-M.; Kim, H.-W.; Kim, Y.-W.; Kim, H.-E.; Heo, S.-J.; Koak, J.-Y. Improved Biological Performance of Ti Implants Due to Surface Modification by Micro-Arc Oxidation. *Biomaterials*, **2004**, 25, 2867–2875. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.048.
3. Jung, R. E.; Pjetursson, B. E.; Glauser, R.; Zembic, A.; Zwahlen, M.; Lang, N. P. A Systematic Review of the 5-Year Survival and Complication Rates of Implant-Supported Single Crowns. *Clinical Oral Implants Research*, **2008**, 19, 119–130. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2007.01453.x.
4. Buser, D.; Janner, S. F. M.; Wittneben, J.; Brägger, U.; Ramseier, C. A.; Salvi, G. E. 10-Year Survival and Success Rates of 511 Titanium Implants with a Sandblasted and Acid-Etched Surface: A Retrospective Study in 303 Partially Edentulous Patients. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, **2012**, 14, 839–851. DOI: 10.1111/j.1708-8208.2012.00456.x.
5. Song, C.; Li, Y.; Gao, C.; Zhang, H.; Chuai, Y.; Song, D. An OTFT Based on Titanium Phthalocyanine Dichloride: A New p-Type Organic Semiconductor. *Materials Letters*, **2020**, 270, 127666. DOI: 10.1016/j.matlet.2020.127666.
- 6 Luo, Y.-R. Comprehensive Handbook of Chemical Bond Energies; *CRC Press*, **2007**. DOI: 10.1201/9781420007282.
- 7 WELSCH, Gerhard; BOYER, Rodney; COLLINGS, E. W. (ed.). Materials properties handbook: titanium alloys. *ASM international*, **1993**. ISN: 978-0-87170-481-8.
- 8 Hu, S.-Z.; Zhou, Z.-H.; Robertson, B. E. Consistent Approaches to van Der Waals Radii for the Metallic Elements. *Zeitschrift für Kristallographie*, **2009**, 224, 375–383. DOI: 10.1524/zkri.2009.1158.
- 9 Penn State University; Book: Introduction to Inorganic Chemistry (Wikibook); [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Book%3A_Introduction_to_Inorganic_Chemistry_\(Wikibook\)](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Book%3A_Introduction_to_Inorganic_Chemistry_(Wikibook)), letöltve 2023. 08. 28.
- 10 Kirmanidou, Y.; Sidira, M.; Drosou, M.-E.; Bennani, V.; Bakopoulou, A.; Tsouknidas, A.; Michailidis, N.; Michalakis, K. New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review. *BioMed Research International*, **2016**, 2016, 1–21. DOI: 10.1155/2016/2908570.
- 11 Lavenus, S.; Louarn, G.; Layrolle, P. Nanotechnology and Dental Implants. *International Journal of Biomaterials*, **2010**, 2010, 1–9. DOI: 10.1155/2010/915327.
- 12 Kasemo, B. Biological Surface Science. *Surface Science*, **2002**, 500, 656–677. DOI: 10.1016/s0039-6028(01)01809-x.
- 13 Diebold, U. The Surface Science of Titanium Dioxide. *Surface Science Reports*, **2003**, 48, 53–229. DOI: 10.1016/s0167-5729(02)00100-0.
- 14 Ma, K.; Zhang, R.; Sun, J.; Liu, C. Oxidation Mechanism of Biomedical Titanium Alloy Surface and Experiment. *International Journal of Corrosion*, **2020**, 2020, 1–9. DOI: 10.1155/2020/1678615.
- 15 Sul, Y.-T.; Johansson, C. B.; Petronis, S.; Krozer, A.; Jeong, Y.; Wennerberg, A.; Albrektsson, T. Characteristics of the Surface Oxides on Turned and Electrochemically Oxidized Pure

- Titanium Implants up to Dielectric Breakdown *Biomaterials*, **2002**, 23, 491–501. DOI: 10.1016/s0142-9612(01)00131-4.
- 16 Cui, Z.-H.; Wu, F.; Jiang, H. First-Principles Study of Relative Stability of Rutile and Anatase TiO₂ Using the Random Phase Approximation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2016**, 18, 29914–29922. DOI: 10.1039/c6cp04973g.
- 17 Javed, F.; Ahmed, H. B.; Crespi, R.; Romanos, G. E. Role of Primary Stability for Successful Osseointegration of Dental Implants: Factors of Influence and Evaluation. *Interventional Medicine and Applied Science*, **2013**, 5, 162–167. DOI: 10.1556/imas.5.2013.4.3.
- 18 Davies, J.; Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*. **1998**, 11, 391–401. PMID: 9922731.
- 19 Hoyos-Nogués, M.; Falgueras-Batlle, E.; Ginebra, M.-P.; Manero, J.; Gil, J.; Mas-Moruno, C. A Dual Molecular Biointerface Combining RGD and KRSR Sequences Improves Osteoblastic Functions by Synergizing Integrin and Cell-Membrane Proteoglycan Binding. *International Journal of Molecular Sciences*, **2019**, 20, 1429. DOI: 10.3390/ijms20061429.
- 20 Cochran, D. L.; Schenk, R. K.; Lussi, A.; Higginbottom, F. L.; Buser, D. Bone Response to Unloaded and Loaded Titanium Implants with a Sandblasted and Acid-Etched Surface: A Histometric Study in the Canine Mandible. *Journal of Biomedical Materials Research*, **1998**, 40, 1–11. DOI: 10.1002/(sici)1097-4636(199804)40:1<1::aid-jbm1>3.0.co;2-q.
- 21 Kim, H.; Choi, S.-H.; Ryu, J.-J.; Koh, S.-Y.; Park, J.-H.; Lee, I.-S. The Biocompatibility of SLA-Treated Titanium Implants. *Biomedical Materials*, **2008**, 3, 025011. DOI: 10.1088/1748-6041/3/2/025011.
- 22 Barbour, M. E.; O’Sullivan, D. J.; Jenkinson, H. F.; Jagger, D. C. The Effects of Polishing Methods on Surface Morphology, Roughness and Bacterial Colonisation of Titanium Abutments. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **2007**, 18, 1439–1447. DOI: 10.1007/s10856-007-0141-2.
- 23 Venkei, A.; Ungvári, K.; Eördegh, G.; Janovák, L.; Urbán, E.; Turzó, K. Photocatalytic Enhancement of Antibacterial Effects of Photoreactive Nanohybrid Films in an in Vitro Streptococcus Mitis Model. *Archives of Oral Biology*, **2020**, 117, 104837. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2020.104837.
- 24 Ionescu, A. C.; Brambilla, E.; Azzola, F.; Ottobelli, M.; Pellegrini, G.; Francetti, L. A. Laser Microtextured Titanium Implant Surfaces Reduce in Vitro and in Situ Oral Biofilm Formation. *PLOS ONE*, **2018**, 13, e0202262. DOI: 10.1371/journal.pone.0202262.
- 25 Seydlova, M.; Teuberova, Z.; Dostalova, T.; Dvorankova, B.; Smetana, K., Jr.; Jelinek, M.; Kocourek, T.; Mroz, W. Biological Properties of Titanium Implants Covered with Hydroxyapatite and Zirconia Layers by Pulsed Laser: In Vitro Study. *Journal of Applied Physics*, **2006**, 99. DOI: 10.1063/1.2158140.
- 26 Tschauner, O.; Ma, C.; Lanzirrotti, A.; Newville, M. G. Riesite, a New High Pressure Polymorph of TiO₂ from the Ries Impact Structure. *Minerals*, **2020**, 10, 78. DOI: 10.3390/min10010078.
- 27 Marchand, R.; Brohan, L.; Tournoux, M. TiO₂(B) a New Form of Titanium Dioxide and the Potassium Octatitanate K₂Ti₈O₁₇. *Materials Research Bulletin*, **1980**, 15, 1129–1133. DOI: 10.1016/0025-5408(80)90076-8.
- 28 Latroche, M.; Brohan, L.; Marchand, R.; Tournoux, M. New Hollandite Oxides: TiO₂(H) and K_{0.06}TiO₂. *Journal of Solid State Chemistry*, **1989**, 81, 78–82. DOI: 10.1016/0022-4596(89)90204-1.

- 29 Takahashi, Y.; Kijima, N.; Akimoto, J. Synthesis, Structural Change upon Heating, and Electronic Structure of Ramsdellite-Type TiO₂. *Chemistry of Materials*, **2006**, *18*, 748–752. DOI: 10.1021/cm0521370.
- 30 Simons, P. Y.; Datchile, F. The Structure of TiO₂II, a High-Pressure Phase of TiO₂. *Acta Crystallographica*, **1967**, *23*, 334–336. DOI: 10.1107/s0365110x67002713.
- 31 El Goresy, A.; Dubrovinsky, L.; Gillet, P.; Graup, G.; Chen, M. Akaogiite: An Ultra-Dense Polymorph of TiO₂ with the Baddeleyite-Type Structure, in Shocked Garnet Gneiss from the Ries Crater, Germany. *American Mineralogist*, **2010**, *95*, 892–895. DOI: 10.2138/am.2010.3425.
- 32 Dubrovinskaia, N. A.; Dubrovinsky, L. S.; Ahuja, R.; Prokopenko, V. B.; Dmitriev, V.; Weber, H.-P.; Osorio-Guillen, J. M.; Johansson, B. Experimental and Theoretical Identification of a New High-Pressure TiO₂ Polymorph. *Physical Review Letters*, **2001**, *87*. DOI: 10.1103/physrevlett.87.275501.
- 33 Ono, S.; Kikegawa, T.; Ohishi, Y. High-Pressure and High-Temperature Synthesis of a Cubic IrO₂ Polymorph. *Physica B: Condensed Matter*, **2005**, *363*, 140–145. DOI: 10.1016/j.physb.2005.03.014.
- 34 Dubrovinsky, L. S.; Dubrovinskaia, N. A.; Swamy, V.; Muscat, J.; Harrison, N. M.; Ahuja, R.; Holm, B.; Johansson, B. The Hardest Known Oxide. *Nature*, **2001**, *410*, 653–654. DOI: 10.1038/35070650.
- 35 Prasai, B.; Cai, B.; Underwood, M. K.; Lewis, J. P.; Drabold, D. A. Properties of Amorphous and Crystalline Titanium Dioxide from First Principles. *Journal of Materials Science*, **2012**, *47*, 7515–7521. DOI: 10.1007/s10853-012-6439-6.
- 36 Sun, S.; Song, P.; Cui, J.; Liang, S. Amorphous TiO₂ Nanostructures: Synthesis, Fundamental Properties and Photocatalytic Applications. *Catalysis Science & Technology*, **2019**, *9*, 4198–4215. DOI: 10.1039/c9cy01020c.
- 37 Ramamoorthy, M.; Vanderbilt, D.; King-Smith, R. D. First-Principles Calculations of the Energetics of Stoichiometric. *Phys. Rev. B*, **1994**, *49*, 16721. DOI: 10.1103/PhysRevB.49.16721
- 38 Momma, K.; Izumi, F. VESTA 3for Three-Dimensional Visualization of Crystal, Volumetric and Morphology Data. *Journal of Applied Crystallography*, **2011**, *44*, 1272–1276. DOI: 10.1107/s0021889811038970.
- 39 Sollazzo, V.; Pezzetti, F.; Scarano, A.; Piattelli, A.; Massari, L.; Brunelli, G.; Carinci, F. Anatase Coating Improves Implant Osseointegration In Vivo. *Journal of Craniofacial Surgery*, **2007**, *18*, 806–810. DOI: 10.1097/scs.0b013e3180a7728f.
- 40 Petkov, V.; Holzhüter, G.; Tröge, U.; Gerber, T.; Himmel, B. Atomic-Scale Structure of Amorphous TiO₂ by Electron, X-Ray Diffraction and Reverse Monte Carlo Simulations. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **1998**, *231*, 17–30. DOI: 10.1016/s0022-3093(98)00418-9.
- 41 Sewald, N.; Jakubke, H. Peptides: Chemistry and Biology; Wiley-VCH, **2009**. DOI: 10.1002/9783527626038.
- 42 Sinha, S.; Tam, B.; Wang, S. M. Applications of Molecular Dynamics Simulation in Protein Study. *Membranes*, **2022**, *12*, 844. DOI: 10.3390/membranes12090844.
- 43 Hollingsworth, S. A.; Dror, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, **2018**, *99*, 1129–1143. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.08.011.
- 44 Rapaport, D. C; The Art of Molecular Dynamics Simulation. *Cambridge University Press*, **2004**, ISBN: 9780521825689
- 45 Phillips, J. C.; *et al.* Scalable Molecular Dynamics on CPU and GPU Architectures with NAMD. *The Journal of Chemical Physics*, **2020**, *153*. DOI: 10.1063/5.0014475.

- 46 Abraham, M.; *et al.* GROMACS 2023 Manual. **2023**. DOI: 10.5281/ZENODO.7588711.
- 47 Bekker, H.; *et al.* Gromacs: A Parallel Computer for Molecular Dynamics Simulations; Physics Computing 92; de Groot, R.A., Nadrchal, J., Eds.; *World Scientific: Singapore*, **1993**. ISBN: 981-02-1245-3.
- 48 Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation. *Computer Physics Communications*, **1995**, *91*, 43–56. DOI: 10.1016/0010-4655(95)00042-e.
- 49 Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D. GROMACS 3.0: A Package for Molecular Simulation and Trajectory Analysis. *Journal of Molecular Modeling*, **2001**, *7*, 306–317. DOI: 10.1007/s008940100045.
- 50 Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C. GROMACS: Fast, Flexible, and Free. *Journal of Computational Chemistry*, **2005**, *26*, 1701–1718. DOI: 10.1002/jcc.20291.
- 51 Hess, B.; Kutzner, C.; van der Spoel, D.; Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **2008**, *4*, 435–447. DOI: 10.1021/ct700301q.
- 52 Pronk, S.; *et al.* GROMACS 4.5: A High-Throughput and Highly Parallel Open Source Molecular Simulation Toolkit. *Bioinformatics*, **2013**, *29*, 845–854. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt055.
- 53 Páll, S.; Abraham, M. J.; Kutzner, C.; Hess, B.; Lindahl, E. Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS. *Lecture Notes in Computer Science*, **2015**, 3–27. DOI: 10.1007/978-3-319-15976-8_1.
- 54 Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX*, **2015**, 1–2, 19–25. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
- 55 Luan, B.; Huynh, T.; Zhou, R. Simplified TiO₂ Force Fields for Studies of Its Interaction with Biomolecules. *The Journal of Chemical Physics*, **2015**, *142*. DOI: 10.1063/1.4922618.
- 56 Liu, S.; Meng, X.-Y.; Perez-Aguilar, J. M.; Zhou, R. An In Silico Study of TiO₂ Nanoparticles Interaction with Twenty Standard Amino Acids in Aqueous Solution. *Scientific Reports*, **2016**, *6*. DOI: 10.1038/srep37761.
- 57 Matsui, M.; Akaogi, M. Molecular Dynamics Simulation of the Structural and Physical Properties of the Four Polymorphs of TiO₂. *Molecular Simulation*, **1991**, *6*, 239–244. DOI: 10.1080/08927029108022432.
- 58 Blazhynska, M. M., *et al.* Recent Advances in Theoretical Investigation of Titanium Dioxide Nanomaterials. A Review. *Kharkov University Bulletin Chemical Series*, **2020**, *34*, 6-56 DOI: 10.26565/2220-637x-2020-34-01.
- 59 Vanommeslaeghe, K.; *et al.* CHARMM General Force Field: A Force Field for Drug-like Molecules Compatible with the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Fields. *Journal of Computational Chemistry*, **2009**, *31*. DOI: 10.1002/jcc.21367.
- 60 Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; Van Gunsteren, W. F. A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation: The GROMOS Force-Field Parameter Sets 53A5 and 53A6. *Journal of Computational Chemistry*, **2004**, *25*, 1656–1676. DOI: 10.1002/jcc.20090.
- 61 Zhou, K.; Liu, B.; Molecular Dynamics Simulation Fundamentals and Applications. *Amsterdam: Academic Press*, **2022**, ISBN: 9780128164198

- 62 Zhang, H.-P.; Lu, X.; Fang, L.-M.; Weng, J.; Huang, N.; Leng, Y. Molecular Dynamics Simulation of RGD Peptide Adsorption on Titanium Oxide Surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **2008**, *19*, 3437–3441. DOI: 10.1007/s10856-008-3498-y.
- 63 Brandt, E. G.; Lyubartsev, A. P. Molecular Dynamics Simulations of Adsorption of Amino Acid Side Chain Analogues and a Titanium Binding Peptide on the TiO₂ (100) Surface. *The Journal of Physical Chemistry C*, **2015**, *119*, 18126–18139. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b02670.
- 64 Sowmiya, M.; Senthilkumar, K. Adsorption of RGD Tripeptide on Anatase (001) Surface – A First Principle Study. *Computational Materials Science*, **2015**, *104*, 124–129. DOI: 10.1016/j.commatsci.2015.03.040.
- 65 Xue, M.; Sampath, J.; Gebhart, R. N.; Haugen, H. J.; Lyngstadaas, S. P.; Pfaendtner, J.; Drobny, G. Studies of Dynamic Binding of Amino Acids to TiO₂ Nanoparticle Surfaces by Solution NMR and Molecular Dynamics Simulations. *Langmuir*, **2020**, *36*, 10341–10350. DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c01256.
- 66 Wu, C.; Chen, M.; Guo, C.; Zhao, X.; Yuan, C. Peptide–TiO₂ Interaction in Aqueous Solution: Conformational Dynamics of RGD Using Different Water Models. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2010**, *114*, 4692–4701. DOI: 10.1021/jp9109223.
- 67 Předota, M.; Bandura, A. V.; Cummings, P. T.; Kubicki, J. D.; Wesolowski, D. J.; Chialvo, A. A.; Machesky, M. L. Electric Double Layer at the Rutile (110) Surface. 1. Structure of Surfaces and Interfacial Water from Molecular Dynamics by Use of Ab Initio Potentials. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2004**, *108*, 12049–12060. DOI: 10.1021/jp037197c.
- 68 Muir, J. M. R.; Costa, D.; Idriss, H. DFT Computational Study of the RGD Peptide Interaction with the Rutile TiO₂ (110) Surface. *Surface Science*, **2014**, *624*, 8–14. DOI: 10.1016/j.susc.2014.01.005
- 69 Koch, R.; Lipton, A. S.; Filipek, S.; Renugopalakrishnan, V. Arginine Interactions with Anatase TiO₂ (100) Surface and the Perturbation of ⁴⁹Ti NMR Chemical Shifts – a DFT Investigation: Relevance to Renu-Seeram Bio Solar Cell. *Journal of Molecular Modeling*, **2010**, *17*, 1467–1472. DOI: 10.1007/s00894-010-0853-y.
- 70 Howard, C. J.; Sabine, T. M.; Dickson, F. Structural and Thermal Parameters for Rutile and Anatase. *Acta Crystallographica Section B Structural Science*, **1991**, *47*, 462–468. DOI: 10.1107/s010876819100335x.
- 71 Smyth, J. R.; Swope, R. J.; Pawley, A. R. H in Rutile-Type Compounds; II, Crystal Chemistry of Al Substitution in H-Bearing Stishovite. *American Mineralogist*, **1995**, *80*, 454–456. DOI: 10.2138/am-1995-5-605.
- 72 Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. OLEX2: A Complete Structure Solution, Refinement and Analysis Program. *Journal of Applied Crystallography*, **2009**, *42*, 339–341. DOI: 10.1107/s0021889808042726.
- 73 Allouche, A.-R. Gabedit-A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. *Journal of Computational Chemistry*, **2010**, *32*, 174–182. DOI: 10.1002/jcc.21600.
- 74 Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, **1996**, *14*, 33–38. DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- 75 Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics*, **1983**, *79*, 926–935. DOI: 10.1063/1.445869.
- 76 MacKerell, A. D., Jr.; *et al.* All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, **1998**, *102*, 3586–3616. DOI: 10.1021/jp973084f.

doi: 10.1038/nmeth.4067

77 Huang, J.; Rauscher, S.; Nawrocki, G.; Ran, T.; Feig, M.; de Groot, B. L.; Grubmüller, H.; MacKerell, A. D., Jr. CHARMM36m: An Improved Force Field for Folded and Intrinsically Disordered Proteins. *Nature Methods*, **2016**, *14*, 71–73. DOI: 10.1038/nmeth.4067.

78 Kumar, S.; Rosenberg, J.M.; Bouzida, D.; Swendsen, R.H.; Kollman, P.A. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. *I. Method J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 1011–1021. DOI: 10.1002/jcc.540130812

79 Arcangeli, C.; Borriello, I.; Gianese, G.; Celino, M.; Morales, P. Organic Functionalization of Metal Oxide Surfaces: An Atomic Scale Modeling Approach. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, **2013**, *5*, 1147–1154. DOI: 10.1166/nnl.2013.1692.

80 Lemkul, J. A.; Bevan, D. R. Assessing the Stability of Alzheimer's Amyloid Protofibrils Using Molecular Dynamics. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2010**, *114*, 1652–1660. DOI: 10.1021/jp9110794.