



國立臺灣大學工學院土木工程學系

碩士論文

Department of Civil Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

以分子動力模擬探討膠原蛋白組織中交聯鍵的分佈對膠原纖維機械行為和結構特性的影響

The influence of crosslink on the mechanical and structural properties of collagen fibril in tissues: A molecular dynamics approach

惠維翰

Wei-Han Hui

指導教授：張書瑋 博士

Advisor: Shu-Wei Chang, Ph.D.

中華民國 108 年 7 月

July, 2019

誌謝



時光飛逝，碩士兩年的時間很快就到了尾聲，感謝這段時間讓我學習以及成長。首先非常感謝指導老師張書瑋教授，在這兩年對我的耐心指導以及研究上的協助。在老師的指導下，讓我了解研究不單純是解決問題，還有發現問題並且提出質疑。並感謝口試委員陳俊杉教授與鄒年棟教授在口試階段給予我寶貴的意見，提供我後續研究的方向並讓我的碩士論文更加完整。

在學期間，感謝跟我一起修課的好夥伴，互相扶持。研究方面，首先非常感謝同屆同學們：李登、林湘迪、邱冠銘以及學弟妹們：葉凱智、江元、蕭羽白、利昕晉等人，在修課上互相幫忙與研究上互相討論與鼓勵，一起度過難關。還有感謝關宇軒學長、陳嫩易學姊在我研究遇到困難時適時給予我建議。感謝這些人讓我的碩士生涯有很大的收穫。此外，還要感謝許多研究所認識的好朋友，在課餘的時候互相關心與鼓勵，讓我在台北的生活感到溫暖。

最後，竭誠地感謝我的家人一直以來的鼓勵與支持，給予我可以無後顧之憂學習的環境，也感謝怡萱在我做出重大決定時總是支持我，給予我向前的動力。我期許自己能不斷的學習和思考，讓所用所學發揮在未來的人生中。

中文摘要



第一型膠原蛋白是人體中一種重要的蛋白質，它構成人體中很多重要的組織，像是骨頭，軟骨，肌腱和韌帶等。在組織中，第一型膠原蛋白透過分子間的交聯鍵連接，來改變組織的物理性質。一般而言，膠原蛋白組織的強度會隨著交聯鍵密度的提升而增加，並且增加其組織的勁度。先前的研究證實了老化現象和交聯鍵密度有正向的關係。除此之外，在實驗上發現非酵素所形成的交聯和一些疾病有關，如糖尿病。

在本研究中，藉由膠原蛋白纖維的全原子模型進行模擬及分析，著重在纖維、分子結構特徵以及降解區域特性。膠原蛋白纖維的 overlap 和 gap 的分佈可以分析滑動與變形機制，膠原蛋白分子的 unit height 和 radius 來分析分子的結構以及變形的機制。本研究提供膠原蛋白分子的變形機制，可以更深入了解組織老化在纖維尺度下的表現。

關鍵字：第一型膠原蛋白，交聯鍵，老化，分子動力學，組織

Abstract

Type I collagen is one of important proteins in the human body. It is rich in human tissues such as bone, cartilage, tendon, ligament, which gives crucial support in human tissues. In tissues, type I collagen molecules form linkage by “Crosslinks”, which utilize covalent bonds to form. Moreover, it can change the physical properties of tissues. In general, tissues can be strengthened with increasing density of cross-links within collagen, which would further higher the stiffness of tissues. However, previous studies have indicated that is a positive correlation between exceeding cross-links’ density and aging problem. In addition, abundant amounts of Crosslinks within non-enzyme structures in tissues were discovered to induce fatal diseases, such as diabetes.

In this study, we focus on structural characteristics of collagen and biological function in fibril through full atomic approach. To analyze the deforming and sliding mechanism of collagen, we analyzed the distribution of overlap and gap within collagen fibril. We further studied the unit height and radius of collagen molecule to understand its structural characteristics and deformation mechanism. Our results provided fundamental insights into the molecular mechanism of collagen, which further give possible explanation of tissue aging.

Keywords: type I collagen, crosslinks, aging, molecular dynamics, tissues

目錄



口試委員會審定書	#
誌謝	i
中文摘要	ii
Abstract	iii
目錄	iv
圖目錄	vi
表目錄	ix
第 1 章、緒論	1
1.1 背景介紹	1
1.2 文獻回顧	2
1.2.1 膠原蛋白分子和纖維的力學行為	2
1.2.2 交聯鍵對膠原蛋白組織的影響	3
1.2.3 膠原蛋白纖維的新陳代謝	7
1.2.4 分子動力模擬	9
1.3 論文目的	10
1.4 論文方向	10
第 2 章、理論與方法	11
2.1 模擬方法	11
2.1.1 分子動力模擬	11
2.1.2 生物分子的勢能參數	14
2.1.3 模擬系統	15
2.1.4 週期性邊界	17
2.2 模型介紹	18
2.2.1 膠原蛋白分子模型	18
2.2.2 膠原蛋白分子間的交聯鍵建立	20
2.2.3 模型資訊	21

2.2.4	模擬的設置及環境條件	23
2.3	分析方法	25
2.3.1	方均根偏移(root-mean-square deviation)分析	25
2.3.2	Unit cell 長度分析	25
2.3.3	頭尾端距(end to end distance)分析	25
2.3.4	overlap and gap 分析	26
2.3.5	Unit height and radius 分析	27
2.3.6	Hydrogen bond 分析	28
第 3 章、	交聯鍵在膠原蛋白纖維到分子的影響	30
3.1	纖維尺度	30
3.1.1	方均根偏移分析	30
3.1.2	Unit cell 長度分析	32
3.1.3	分子頭尾端距分析	33
3.1.4	Overlap and gap 分析	35
3.2	分子尺度	44
3.2.1	分子的 unit height 分析	44
3.2.2	分子的 radius 分析	48
3.3	結果與討論	51
第 4 章、	交聯鍵對膠原蛋白的降解區域的影響	54
4.1	降解區域頭尾端距分析	55
4.2	降解區域 unit height 分析	57
4.3	降解區域 radius 分析	63
4.4	降解區域 hydrogen bond 分析	67
4.5	結果與討論	70
第 5 章、	結論與未來展望	72
5.1	總結	72
5.2	未來展望	73
	參考資料	74

圖目錄



圖 1-1 現在的實驗以及計算方法的之進展。[4]	1
圖 1-2 多尺度的骨骼結構	2
圖 1-3 不同 enzymatic cross-link 種類(a.) dehydro-lysino-norleucine crosslink (b.)... 4	
圖 1-4 (a.)不成熟交聯鍵(b.)成熟交聯鍵，隨著年齡增加交聯鍵的會從不成熟的雙鍵 轉成成熟的三鍵或四鍵。[36]	5
圖 1-5 (a.)Glucosepane(b.)為 Pentosidine，其中 Glucosepane 和 type II 糖尿有關， 而 Pentosidine 主要和老化有關。[51]	6
圖 1-6 骨頭壓力試驗，黑色點為正常老鼠，黑色的點為患有糖尿病的老鼠，請且隨 著年齡變化。[59]	6
圖 1-7MMP1(matrix metalloproteinase 1) 與膠原蛋白作用之示意圖。	8
圖 1-8 X 軸為應變，Y 軸為酵素對膠原蛋白降解的效率。	8
圖 2-1 多尺度的研究架構[12]	11
圖 2-2 分子動力模擬的計算方法及架構[88]	12
圖 2-3 週期性邊界示意圖(http://isaacs.sourceforge.net/phys/pbc.html)。	17
圖 2-4 交聯鍵模型建立流程圖	20
圖 2-5 交聯鍵接點位置示意圖(a.) dehydro-lysino-norleucine crosslink 的接點(b.) Glucosepane crosslink 的接點位置	22
圖 2-6 為膠原蛋白纖維示意圖。	23
圖 2-7 週期性邊界效應下，膠原蛋白纖維模型示意圖。	24
圖 2-8 膠原蛋白分子頭尾端距示意圖。	26
圖 2-9(a.)為計算 overlap 和 gap 示意圖，而(b.)則依據所算之 overlap 和 gap 長 度，所劃分出的區域。	26
圖 2-10 膠原蛋白分子結構分析[95]	28
圖 2-11 氫鍵示意圖。	29
圖 3-1 在 1atm 下的 RMSD 分析	30
圖 3-2 樣本時間 35ns~40ns 中，(a.)RMSD 的 Standard deviation(b.)平均的 RMSD。	

.....	30
圖 3-3 在 60MPa 下的 RMSD 分析	31
圖 3-4 樣本時間 7ns~10ns 中，(a.)RMSD 的 Standard deviation(b.)平均的 RMSD。	31
圖 3-5 在 1atm 下，(a.) D-period 的長度變化(b.)D-period 的平均長度。	32
圖 3-6 在 60MPa 下，(a.)D-period 的長度變化(b.)D-period 的平均長度。	32
圖 3-7 在 1atm 下，(a.)分子頭尾端距的變化(b.)平均分子的頭尾端距。	33
圖 3-8 在 60MPa 下，(a.)分子頭尾端距的變化(b.)平均分子的頭尾端距。	34
圖 3-9(a.)1atm-60MPa 之伸長量(b.)1atm-60MPa 之應變。	34
圖 3-10 在 1atm 下，各個模型的 overlap/gap ratio。	35
圖 3-11 在 1atm 下，(a.)overlap 平均長度及(b.)gap 的平均長度。	35
圖 3-12 在 1atm 下，(a.)各區段氨基酸殘基的差值，(b.)overlap 和 gap 氨基酸殘基的差距。	36
圖 3-13 在 1atm 下，各模型依照 overlap 和 gap 長度區分的纖維圖。	37
圖 3-14 在 1atm 下，對照 Normal 模型氨基酸殘基分佈的纖維圖。	37
圖 3-15 在 60MPa 下，各個模型的 overlap/gap ratio。	38
圖 3-16 在 60MPa 下，(a.)overlap 平均長度及(b.)gap 的平均長度。	39
圖 3-17 在 60MPa 下，(a.)各區段氨基酸殘基的差值，(b.)overlap 和 gap 氨基酸殘基的差距。	39
圖 3-18 在 60MPa 下，各模型依照 overlap 和 gap 長度區分的纖維圖。	40
圖 3-19 在 60MPa 下，對照 Normal 模型氨基酸殘基分佈的纖維圖。	41
圖 3-20 Normal 模型在不同應力下的氨基酸殘基分佈纖維圖。	42
圖 3-21 deH22 模型在不同應力下的氨基酸殘基分佈纖維圖。	42
圖 3-22 deH44 模型在不同應力下的氨基酸殘基分佈纖維圖。	43
圖 3-23 AGEs 模型在不同應力下的氨基酸殘基分佈纖維圖。	43
圖 3-24 在 1atm 下，樣本時間內 35ns-40ns 的 unit height 的分佈。	44
圖 3-25 在 1atm 下，樣本時間內分子所有 unit height 的平均分佈。	45
圖 3-26 在 60MPa 下，樣本時間內 7ns-10ns 的 unit height 的分佈。	46
圖 3-27 在 60MPa 下，樣本時間內分子所有 unit height 的平均分佈。	47

圖 3-28 在 1atm 下，樣本時間內 35ns-40ns 的 radius 的分佈。	48
圖 3-29 在 1atm 下，樣本時間內分子所有 radius 平均的分佈。	49
圖 3-30 在 60MPa 下，樣本時間內 7ns-10ns 的 radius 的分佈。	49
圖 3-31 在 60MPa 下，樣本時間內分子所有 radius 平均的分佈。	50
圖 3-32 從 1atm 到 60MPa，(a.)overlap 的伸長量，(b.)gap 的伸長量。	52
圖 4-1 unit height 和 radius 參考圖。	54
圖 4-2 在 1atm 下，降解區域的頭尾端距	55
圖 4-3 在 60MPa 下，降解區域的頭尾端距	55
圖 4-4(a.)1atm 到 60MPa 的降解區域伸長量(b.) 1atm 到 60MPa 的降解區域應變	56
圖 4-5 在 1atm 下，降解區域 35ns-40ns 的 unit height 的分佈。	57
圖 4-6 在 1atm 下，樣本時間內降解區域所有距離的平均分佈。	58
圖 4-7 在 1atm 下，降解區域的 unit height 分佈。	59
圖 4-8 在 60MPa 下，降解區域 7ns-10ns 的 unit height 的分佈。	60
圖 4-9 在 60MPa 下，樣本時間內降解區域所有距離平均的距離分佈。	61
圖 4-10 在 60MPa 下，降解區域的 unit height 分佈。	62
圖 4-11 在 1atm 下，講解區域 35ns-40ns 的 radius 分佈。	63
圖 4-12 在 1atm 下，樣本時間內降解區域所有 radius 的平均分佈。	64
圖 4-13 在 1atm 下，降解區域的 radius 分佈。	64
圖 4-14 在 60MPa 下，降解區域 7ns-10ns 的 radius 分佈。	65
圖 4-15 在 60MPa 下，樣本時間內降解區域所有距離平均的 radius 分佈。	66
圖 4-16 在 60MPa 下，降解區域的 radius 分佈。	66
圖 4-17 在 1atm 下，降解區域的氫鍵總數。	67
圖 4-18 在 60MPa 下，降解區域的氫鍵總數。	68

表目錄

表 2-1 為各模型 crosslink 接點位置.....	21
表 4-1 在 1atm，60MPa 下，各模型氫鍵整理。.....	68



第1章、緒論



1.1 背景介紹

膠原蛋白分子(Collagen molecule)是人體中極為重要的基本建築材料，膠原蛋白分子佔人體中蛋白質的三分之一，提供人體中許多組織所需的彈性與強度[1-3]，如:皮膚、肌腱、角膜、骨骼皆由膠原蛋白所組成。這些締結組織，都展現不同的力學行為以及特性，這些差異來自於更小層級的結構影響。

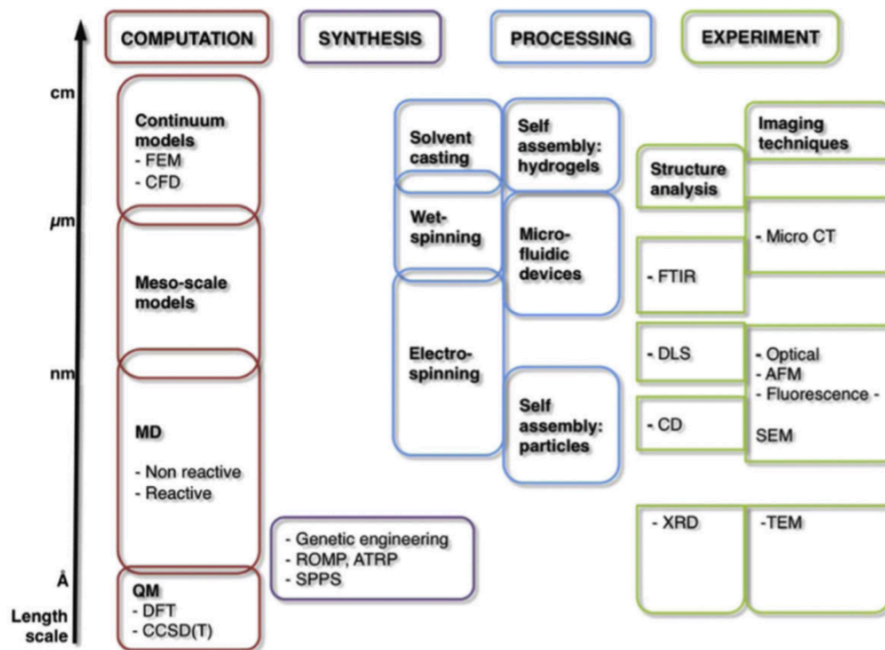


圖 1-1 現在的實驗以及計算方法的之進展。[4]

現在的實驗以及計算方法的之進展如圖 1-1，不同尺度的實驗可以搭配不同的模擬計算方式，來佐證或找出實現結果。本研究以原子的尺度出發，來讓我們了解胺基酸序列與蛋白結構之關聯性。近年來，隨著各方面實驗與計算領域的進步，使我們能更進一步的研究這些材料的微觀結構與特性，了解這些結構可以讓我們更了解人體的組織如何運作，更可以幫助實驗了解更多資訊。



1.2 文獻回顧

1.2.1 膠原蛋白分子和纖維的力學行為

膠原蛋白分子是一種重要的蛋白質結構，屬於細胞外基質(Extracellular matrix)其中一種組成物，是由三條胺基酸序列組成三股螺旋結構再自組裝形成膠原纖維[5]，有著許多特別的力學性質[6]，像是重複拉伸會增加組織勁度或是變形不均勻等[7]，而膠原纖維為許多組織的基本成分，如：軟骨[8]、角膜[9, 10]、皮膚[11]、骨骼；人體中由膠原蛋白所組成的組織皆由複雜的結構設計所組成以滿足人體所需的力學性質，以骨骼為例，圖 1-2 為骨骼的微觀結構，骨骼是透過兩種基本材料：膠原蛋白分子(collagen molecule)與礦物質 (hydroxyapatite nanocrystal)[12, 13]，以複雜的結構設計組成一種多尺度的 hierarchical material；在骨骼的生成過程中，首先膠原蛋白分子會以獨特的排列方式形成微膠原纖維，並在微纖維中預留下空間，接著礦物質便會堆積在這些空間中形成具有礦物質的微膠原纖維(mineralized collagen fibril)，而這些微膠原纖維則會成為骨骼的基本元件，再透過複雜的結構設計組成骨單位 (osteons)與骨小管(haversian canals)，最後再形成骨骼，這些巧妙的設計提供骨骼所需的力學特性與強度[14-16]。

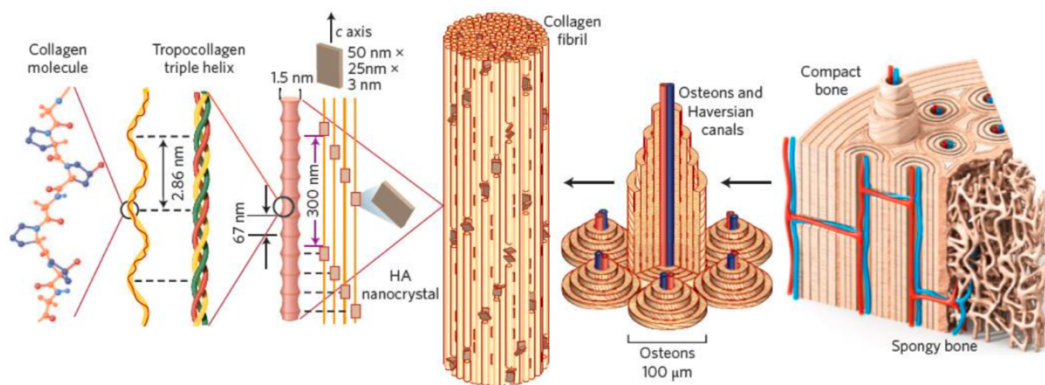


圖 1-2 多尺度的骨骼結構

因為骨骼是一種由膠原蛋白分子與礦物質組成之 hierarchical structure，其微觀結構設計是骨骼能有良好力學性質的重要原因，所以我們在觀察膠原蛋白組織中的問題時必須先從尺度較小的膠原蛋白分子來分析[17]，膠原蛋白分子由兩條 α -1 鏈與一條 α -2 鏈所組成，其中每一條序列皆由 $(\text{Gly-Xaa-Yaa})_n$ 所組成，Xaa 與 Yaa 常為 proline 與 hydroxyproline，這兩種序列也是提供膠原蛋白分

子穩定的關鍵[18-21]，膠原蛋白分子共有約 28 種型態，其中 第一型(type I)、第二型(type II)與第三型(type III)膠原蛋白最為常見，第一型膠原蛋白是人體中最多的一種膠原蛋白，是皮膚、肌腱與骨骼的主要成分，第二型膠原蛋白則為軟骨的主要成分，而第三型膠原蛋白則存在於皮膚中，通常與第一型膠原蛋白同時存在[22]。

膠原蛋白分子在堆疊成纖維時，會形成重疊區(overlap region)以及空隙區(gap region)，並且纖維在堆疊時會有重複性，一個重疊區會和一個空隙區重複出現，我們定義這個單元為 D-period，重疊區的分子重疊密度高，而空隙區則相反[23]，這代表膠原蛋白纖維為非均質的材料(homogeneous material)，以骨骼來說，空隙區會有較多的礦化結晶的堆積[24-30]，讓膠原蛋白分子的力學行為更加複雜。

目前已有許多研究致力於探討膠原蛋白序列對於膠原蛋白組織疾病的影響，而本研究的目的在於利用原子尺度計算方法，更進一步的深入探討交聯鍵(crosslink)在膠原蛋白纖維中機械行為和結構特性的影響。

1.2.2 交聯鍵對膠原蛋白組織的影響

人體的器官組織會隨著年齡而老化，其中膠原蛋白是分佈在許多重要組織中的蛋白質，所以膠原蛋白的老化及病變尤其重要[31-34]，在先前的研究中，我們發現交聯鍵的含量以及類型會影響組織以及器官的力學行為並且導致疾病，像是骨骼老化變為脆性，軟骨硬化，並且有些疾病會反向讓我們的組成形成特別的交聯鍵，進而造成其他器官的病變，例如糖尿病(diabetes)[35]，其形成的交聯鍵會讓我們的微血管硬化堵塞，並讓組織壞死。

膠原蛋白的老化以及疾病和交聯鍵(crosslink)的含量以及類型有關，依照生成的方式交聯鍵可以分為酵素作用的交聯鍵(enzymatic crosslink)以及非酵素作用的交聯鍵(non-enzymatic crosslink)[36, 37]。

在我們身體中產生酵素作用的交聯鍵屬於正常產生的反應[38]，並且隨著年紀的增長會增加含量或改變形態，這類的交聯鍵主要發生在膠原蛋白序列中的賴氨酸(lysine)以及經過修飾的羥賴氨酸(hydroxylysine)上，在形成交聯鍵的過程經過氧化(lysyl oxidase)的修飾，修飾後的賴氨酸和羥賴氨酸會和相鄰分子一樣經過修飾的氨基酸進行脫水以及連結，最後會讓膠原蛋白分子與分子間的連結增強，以提升纖

維的強度[39]。

隨著年齡增長，交聯鍵的形態以及含量也會改變，膠原蛋白分子剛形成時，主要所形成的交聯鍵為雙鍵像是 dehydro-lysino-norleucine crosslink，我們稱為不成熟交聯鍵(immature crosslink)，他會連接兩個膠原蛋白分子，其發生位置通常在膠原蛋白碳末端鏈(telopeptide)，當年齡上升時，這類的交聯鍵會發生些化學反應，變成三鍵或四鍵，稱為成熟的交聯鍵(mature crosslink)，如 Lysyl-pyrrole crosslink 和 Histidino-hydroxy merodesmosine crosslink 圖 1-3(a,b,c)，圖 1-4 (a,b)，並且有些會分佈在膠原蛋白分子的主要序列中。先前的研究指出接點越多的交聯鍵和越高的交聯的密度，會有越高的纖維強度[40-42]，並且做拉伸分子動力模擬(steered molecular dynamics)，N 端鏈和 C 端鏈的力學性質也不盡相同[43,44]，最明顯的結果就是剛出生嬰兒的皮膚，其彈性會比成人的皮膚來的低。

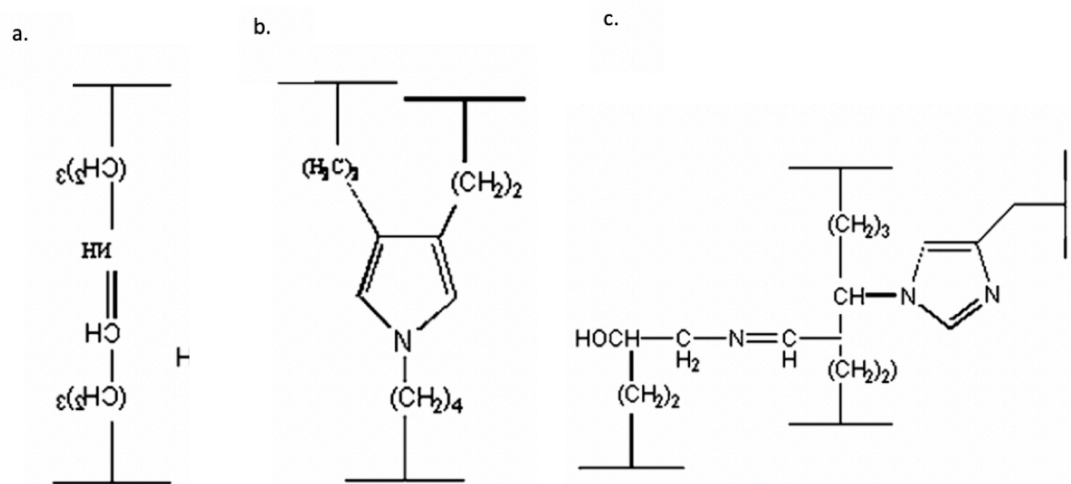


圖 1-3 不同 enzymatic cross-link 種類(a.) dehydro-lysino-norleucine crosslink (b.) Lysyl-pyrrole crosslink (c.) Histidino-hydroxy merodesmosine crosslink。[51]

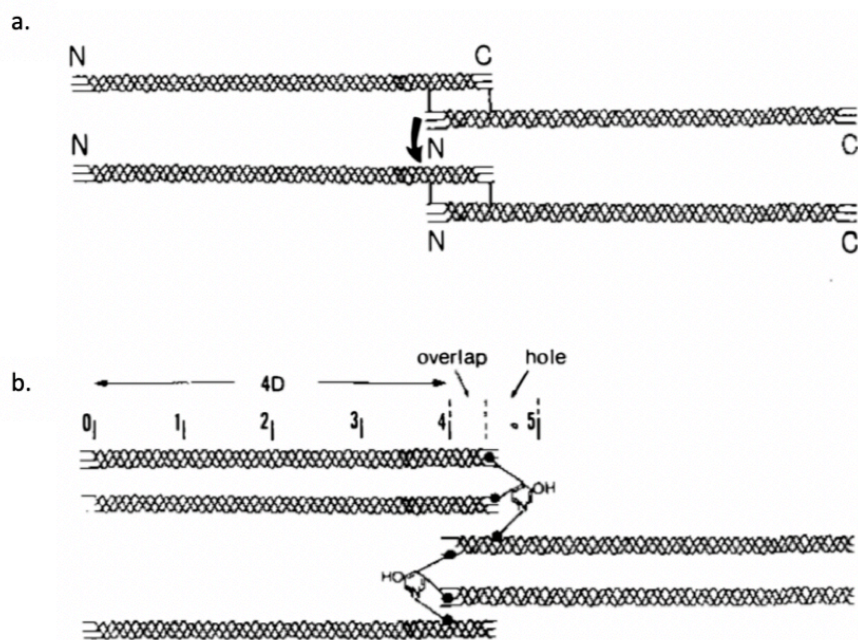


圖 1-4 (a.)不成熟交聯鍵(b.)成熟交聯鍵，隨著年齡增加交聯鍵的會從不成熟的雙鍵轉成成熟的三鍵或四鍵。[36]

非酵素作用的交聯鍵，有很多產生的機制，但我們最主要探討的是由體內美拉德反應(Maillard Reaction)所產生的交聯鍵，因為是和醣類發生化學反應後的產物我們稱為 AGEs(Advance Glycation End-products)[45-47]，這種交聯鍵會同時受老化以及疾病的影響所產生[48-53]，並且存在於代謝週期較長的組織器官[54-61]，例如骨頭。這會使得這些老化的組織難以代謝並且累積在組織之中。先前的研究指出 AGEs 會讓膠原蛋白纖維在力學行為以及生物功能上有著嚴重的衝擊[62-64]，AGEs 形成的交聯鍵不僅僅是膠原蛋白分子與分子間(inter-molecular)的鍵結，有一些交聯鍵會在單一膠原蛋白分子內形成分子內(intra-molecular)的鍵結，這類的鍵結會使得受壓力的膠原蛋白組織延展性下降，也讓整體纖維的勁度下降[65, 66]，最終會原本應該提供韌性的膠原蛋白纖維失去彈性，讓我們的受壓組織失去彈性進而發生脆性破壞。而受拉力的組織的勁度，以及吸收應變能的能力會提升[67]，但是分子間的滑移機制會受到限制且由膠原蛋白分子代償[68]，並且破壞的行為是較為脆性。除了改變力學性質外，AGEs 還會在生物功能上造成影響，AGEs 的交聯鍵除了原本的賴氨酸和賴氨酸的點位外，還會有精氨酸和賴氨酸(Arginine)的點位[69]，其結構如圖 1-5，尤其精氨酸位置較靠近酵素以及細胞的作用區域，可能

會影響作用區域附近的結構，造成膠原蛋白分子醉於酵素產生抵抗性，最終讓整體組織無法新成代謝(remodeling)讓老化及病變累積在組織中，除此之外在骨頭中也會讓成骨細胞和破骨細胞的活動力下降[70]。

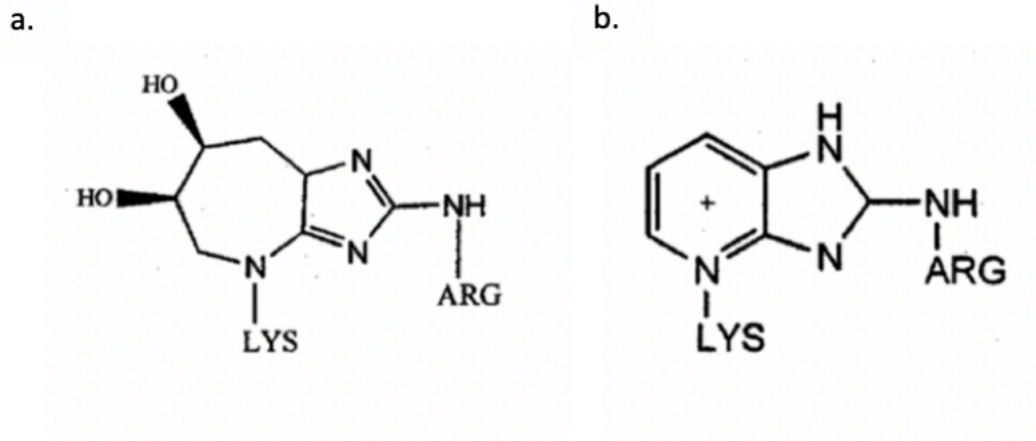


圖 1-5 (a.)Glucosepane(b.)為 Pentosidine，其中 Glucosepane 和 type II 糖尿有關，而 Pentosidine 主要和老化有關。[51]

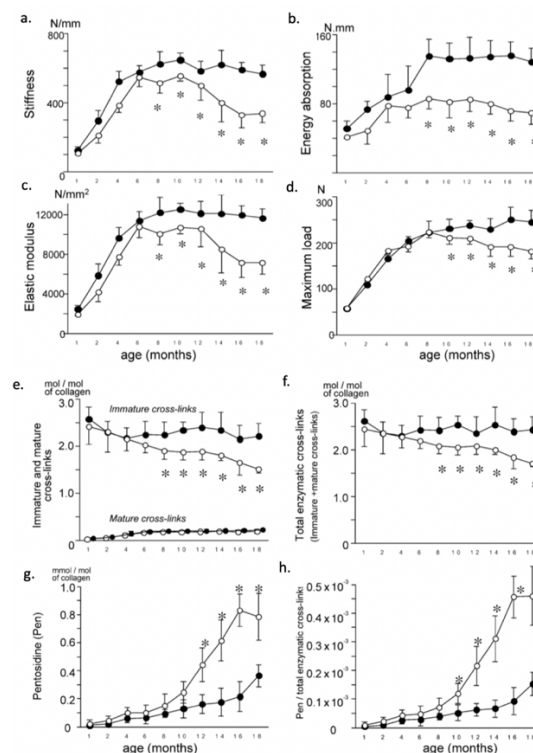


圖 1-6 骨頭壓力試驗，黑色點為正常老鼠，黑色的點為患有糖尿病的老鼠，請且隨

著年齡變化。[59]

圖 1-6(a.)為膠原蛋白強度和年紀的關係，(b.)為應變能與年紀的關係，(c.)為彈性模數與年紀的關係，(d.)為最大載重與年紀的關係，(e.)為成熟以及不成熟交聯鍵的含量分佈與年紀的關係，(f.)為總共酵素所形成的交聯鍵含量和年紀的關係，(g.)為 Pentosidine 的含量與年紀的關係，(h.)為 Pentosidine 除上全部酵素所形成的交聯鍵的比值。從實驗顯示隨著年紀增長，不成熟的交聯鍵會減少，而成熟的交聯鍵會增加，原因是隨著年紀增加不成熟的交聯鍵會因為一些化學反應轉變成成熟的交聯鍵，而 Pentosidine 的含量明顯的增加，代表 AGEs 會和年紀有正向的相關，而患有糖尿病的老鼠 Pentosidine 含量明顯比正堂老鼠高過許多，說明糖尿病跟 AGEs 含量有正向的相關，(a.)(b.)(c.)(d.)說明在 AGEs 含量高的骨頭中，會展現較弱的強度，並且柔軟度以及吸收應變的能力下降會讓組織表現出脆性的性質，使得最後破壞的載重也下降。[67]

1.2.3 膠原蛋白纖維的新陳代謝

人體的組織每天都會進行新陳代謝，就是進行著吸收(Absorption)與合成(Synthesis)的動態平衡(Dynamic equilibrium)[71, 72]，然而有些疾病會破壞這平衡。以骨頭為例，成骨細胞和破骨細胞會每天代謝我們的骨組織，而當身體的某些酵素有異常時，成骨細胞的活性會降低，而破骨細胞反之上升，這會讓我們的骨頭不斷的被分解，讓無法提高礦化的質量，最終我們的骨頭很容易就形成脆性破壞，也就是我們所說的骨質疏鬆症。

膠原蛋白組織也會透過新陳代謝來維持組織的機械能力，細胞所負責合成，而酵素負責吸收，膠原蛋白被切割的地方主要離 N 端約 3/4 的地方，其切割膠原蛋白的酵素主要為 MMP1(matrix metalloproteinase 1)如圖 1-7[73, 74]，是含有金屬離子的蛋白質酵素，其結構主要分為 Catalytic 和 Hemopexin，而 Catalytic 鋅離子附近的氨基酸會和膠原蛋白產生穩定的氫鍵，在穩定的接上去後，蛋白質酵素會讓膠原蛋白進行解旋(unwinding)[75]，在進行化學反應，切斷氨基酸的主鏈(backbone)。

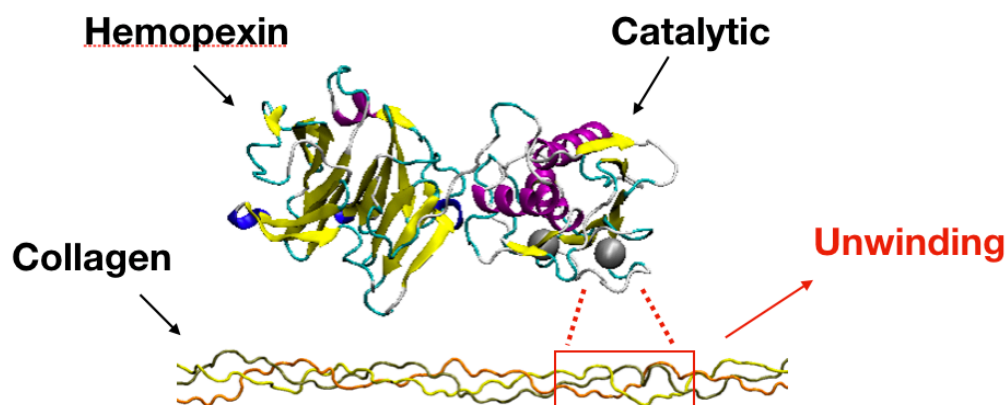


圖 1-7MMP1(matrix metalloproteinase 1) 與膠原蛋白作用之示意圖。

先前有研究指出膠原蛋白分子是一個對酵素具有抵抗性的蛋白質[76]，在沒外力的環境下，膠原蛋白會有展開的現象(unfolding)這會讓切割位置暴露出來[77]，讓膠原蛋白容易被降解(degradation)，但隨著外力增加，三股螺旋結構緊縮[78]，以致於酵素無法形成穩定的氫鍵，讓降解的能力下降[79]，進而避免膠原蛋白在應力下被切割。

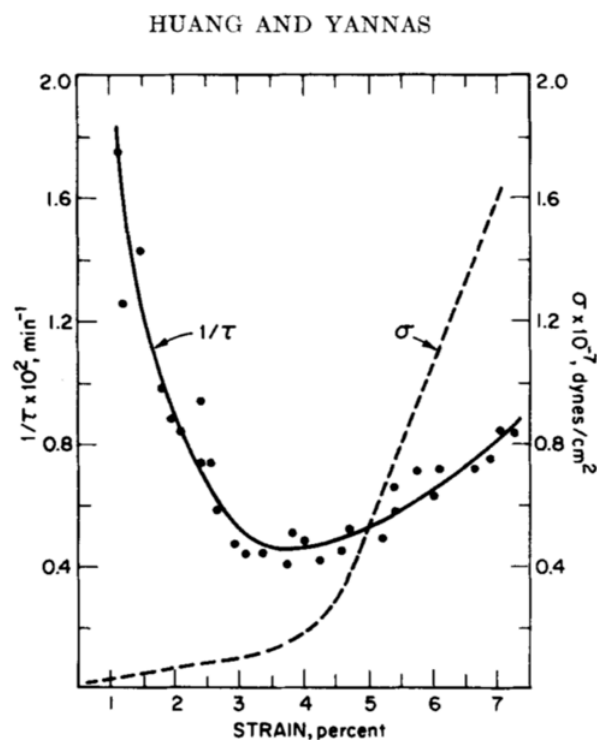


圖 1-8 X 軸為應變，Y 軸為酵素對膠原蛋白降解的效率。

圖 1-8 X 軸為應變，Y 軸為酵素對膠原蛋白降解的效率，虛線為應力，可以觀察到隨著應變的增大，酵素對膠原蛋白降解的效率隨之下降，但過應變約 4%，酵素切割能力又轉為上升，且我們可以看到應力開始快速增加，主要的原因是膠原蛋白分子的三股螺旋結構開始解旋，讓三條氨基酸主鏈拉直，在沒有其他主鏈的阻擋下，酵素會更容易切割。[79]

然而在老化的過程中，形成不同的交聯，和交聯的質量密度會影響酵素作用的效率[80]，先前的實驗指出，老化的膠原蛋白纖維在無外力的情況下，比正常的膠原蛋白纖維難降解，但隨著外力的拉伸，老化的膠原蛋白反而更容易被降解[81,82]，這和單一膠原蛋白分子受外力會抵抗酵素切割的結果相反。這和分子的堆疊以及交聯鍵有著密切的關係。

1.2.4 分子動力模擬

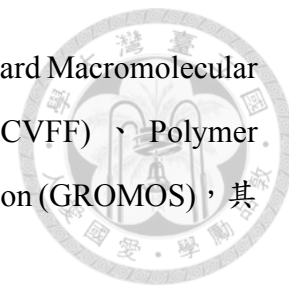
分子動力模擬是一種利用電腦計算，使我們能夠在奈米尺度下研究材料之性質的一種方法。而分子動力模擬的基本原理就是古典牛頓力學，透過電腦計算複雜的積分方程式，我們可以計算所有原子的運動軌跡，藉此來分析各種材料的性質。

此方法最初是在 1950 年後期發想出來的[83,84]，並在理論物理學的領域中，不斷地被推導開發而出。但是在近幾年，分子動力模擬已被廣泛地應用於化學物理、材料科學以及生物分子建模領域中。分子動力學具有低成本、高安全性、研究速度快速與高變異性等優點，適合用於模擬分析。除了上述優點外，分子動力模擬的結果還能與實驗結果進行比較，相輔相成。因此，他已逐漸地成為實驗技術中的一種強而有力的研究方法。以下是描述分子動力模擬的計算方法。

1950 年，分子動力學最初是由 Irving 與 Kirkwood 兩位學者所發表[85]。利用潛勢能方程式來描述分子間的受力，並且運用牛頓運動方程式計算出模型中每一顆原子的運動軌跡以及速度。最後，再利用統計熱力學來獲得分子相應的物理性質與動態特性。

如今，許多的不同力場(forcefield) 已在許多領域廣泛運用。力場的種類有分很多種，如:Generic force fields、 Biological force fields 以及 Class II force fields 等。其中，Biological force fields 則是為了生物分子而開發的，例如: Assisted Model

Building with Energy Refinement(AMBER)[86]、Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics(CHARMM)[87]、Consistent Valence Force Field(CVFF)、Polymer Consistent Force Field(PCFF) 以及 GRONingen Molecular Simulation (GROMOS)，其中 AMBER 和 CHARMM 主要被拿來作為蛋白質的力場。



1.3 論文目的

本研究目的是利用分子動力學的方法，來探討在組織中交聯鍵對膠原蛋白纖維所造成的力學性質，以及生物動態平衡的影響。我們選擇酵素所形成的 dehydro-lysino-norleucine crosslink 以及非酵素所形成的 Glucosepane 來作為我們主要研究的交聯鍵。我們從原子尺度出發，到纖維的尺度，透過不同的濃度含量以及不同型態的交聯鍵，來了解在生物體中的膠原蛋白纖維所表現出的行為，進而更了解組織運作的機制。

1.4 論文方向

本論文的方向，第二章主要說明分子動力學模擬的基礎，並且說明所選擇的力場以及模擬條件，再來是解釋本研究所使用的分析方法。第三章主要透過一些力學行為和結構的分析，來說明不同酵素交聯鍵對膠原蛋白纖維力學以及結構表現的影響，第四章我們控制不同的交聯鍵分析在 MMP1(Matrix metalloproteinase-1)作用區域的結構變化，最後第五章為本研究的討論以及未來之展望。

第2章、理論與方法



2.1 模擬方法

2.1.1 分子動力模擬

本研究以原子尺度出發的多尺度計算方法來探討膠原纖維組織的微觀結構(如圖 2-1 所示)，建立具有原子尺度精度的膠原纖維模型，探討胺基酸序列與力學性質及疾病間的關聯，研究膠原纖維分子組成與力學性質的關聯性，幫助我們了解膠原纖維相關疾病的分子起源與成因。

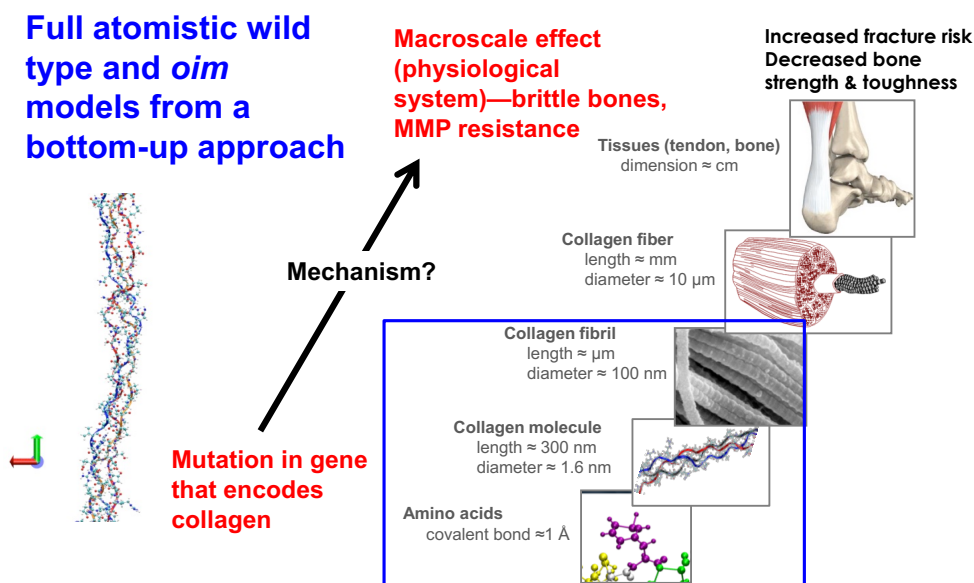


圖 2-1 多尺度的研究架構[12]

圖 2-1 為研究架構，由於膠原蛋白分子是膠原纖維的基本成分，而膠原纖維又是人體中許多重要組織的基本組成，因此本研究利用以原子尺度出發的計算方法，從建立具有原子尺度精確度的膠原蛋白分子開始，深入研究膠原蛋白序列與組織巨觀特性的關聯性。

分子動力模擬能提供原子尺度的精確生物分子模型，並計算生物分子的動態行為，因此本研究採用分子動力模擬來研究膠原蛋白分子的結構，利用分子動力模擬，我們可以建立不同胺基酸序列的膠原蛋白分子並研究其結構與動態行為的差異，分子動力模擬近年來已被廣泛應用於各種生物分子與相關機制探討的研究，在一個分子動力模擬的系統中，每一個分子中的原子皆被視為一個獨立的質點，具有質量 m_i 、位置向量 r_i 、速度向量 v_i 與加速度向量 a_i (如圖 2-2 所示);經由準

確的計算原子與原子間的相互作用力以及計算每一個原子的運動方程式，分子動力模擬能提供系統中每一顆原子的動態歷程(dynamical trajectory)。

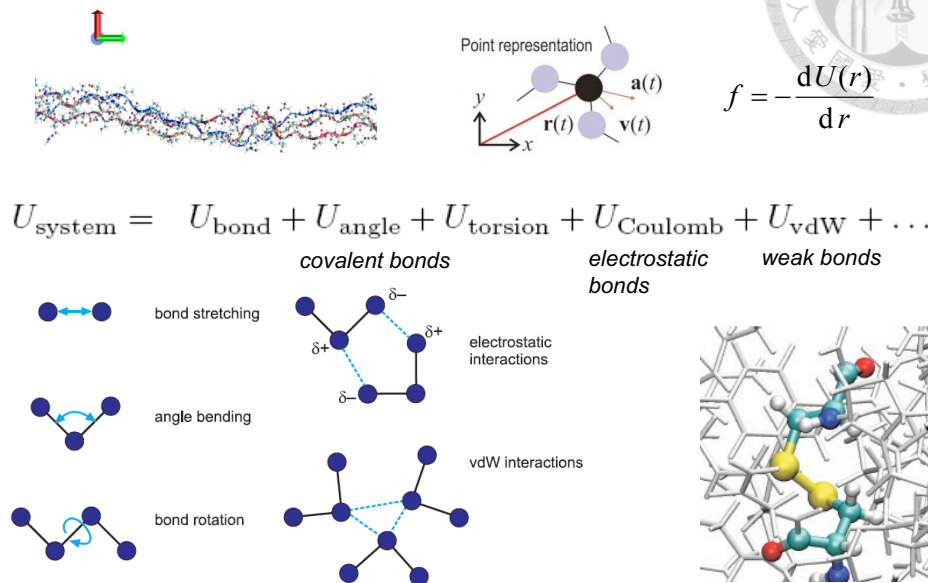


圖 2-2 分子動力模擬的計算方法及架構[88]

膠原蛋白分子以及分子動力模擬計算方法:在一個分子動力模擬的系統中，每一個分子中的原子皆被視為一個獨立的質點，具有質量 m_i 、位置向量 $\mathbf{r}_i$ 、速度向量 $\mathbf{v}_i$ 與加速度向量 $\mathbf{a}_i$ 。

其中動能為:

$$K = \frac{1}{2m} \sum_i p_i^2$$

第 i 個原子的動量 P_i 由其速度決定:

$$P_i = m\dot{\mathbf{r}}_i$$

在分子動力模擬中，系統中的總勢能 U 由每顆原子的座標決定:

$$U = U(r_1, r_2, \dots, r_n)$$

將系統的總能量對時間微分可以得到:

$$\frac{1}{m} \sum_i p_i \cdot \dot{p}_i + \sum_i \frac{\partial U}{\partial r_i} \cdot \dot{r}_i = 0$$

將 $P_i = m\dot{\mathbf{r}}_i$ 帶入上式:

$$\sum_i \left(\dot{p}_i + \frac{\partial U}{\partial r_i} \right) \cdot \dot{r}_i = 0$$

上式中，由於每顆原子的速度各自獨立，上式條件成立的條件為，對每一個系統中的原子必須滿足：

$$\frac{\partial U}{\partial r_i} = -\dot{p}_i$$

或是

$$\frac{\partial U}{\partial r_i} = -f_i$$

上式表示，在一個分子動力模擬中，最重要的是對於原子與原子間交互作用力的勢能 $U = U(r_1, r_2 \dots, r_n)$ 的描述(亦稱為 force field) 一旦有了準確的勢能，透過計算勢能的 negative gradient 即可求得每顆原子所受的力，再經由牛頓運動定律與數值積分，即可求得系統中每一個原子的動態歷程。





2.1.2 生物分子的勢能參數

在一個適用於生物分子模擬的勢能中(如 CHARMM force field)，勢能可以用以下形式表示：

$$U = U_{bond} + U_{angle} + U_{torsion} + U_{coulomb} + U_{vdW} + \dots$$

在上式中，一個重要的假設是，一個分子的勢能可以被視為多項勢能的總和，包含 bond stretching、angle bending 等。

一般來說，bond energy 為：

$$U_{bonds} = \sum_{bonds} K_i(b_i - b_0)$$

其中 b_0 代表此鍵的平衡長度， b_i 為連結此鍵的兩顆原子間的距離， K_i 代表此鍵的彈性係數。在一個分子動力模擬中， b_0 與 K_i 由此鍵的類別所決定。相似的，勢能中的 angle 與 torsion terms 可以由下式計算：

$$U_{angle} = \sum_{angles} K_\theta(\theta - \theta_0)$$

與

$$U_{torsion} = \sum_{torsions} K_\chi(1 + \cos(n\chi - \delta))$$

其中不論是 bond、angle 或 torsion energy，其能量總和皆是系統中每一個 bond、angle 與 torsion 的能量總和，而每一個能量計算中所需的參數都在 CHARMM force field 中可以找到。

$U_{coulomb}$ 和 U_{vdW} 則分別代表系統中的電荷勢能與凡德瓦爾力勢能，值得一提的是，由於在一個分子動力模擬中，系統的勢能是準確的由每一個原子與原子間的交互作用力所決定，分子動力模擬能提供我們精確的計算複雜的生物分子之結構與動態行為，然而由於分子動力模擬的計算量相當龐大，通常分子動力模擬的系統受限於 ~ 100 nm 的尺度以及 ~ 100 ns 的時間尺度。

2.1.3 模擬系統

在分子動力模擬中，平衡的模擬系統主要分為四種：NVE、NVT、NPT 和 NpH，在不同的模型以及邊界條件下選取不同的模擬系統來模擬[89]，NVE 是獨立出來的分子動力模擬系統，而 NVT、NPT 和 NpH 是拉格朗原理(Lagrangian)的延伸，其中 NPT 和 NpH 只適用在週期性邊界。N 代表模型的原子數、V 代表系統體積、E 代表系統能量、P 代表系統壓力、T 代表系統溫度、H 代表系統的焓(enthalpy)。

NVE 系統是在恆定原子數、系統體積和系統能量做系統平衡，在相互作用下為完全彈性以及成對作用下，系統的能量以及動量皆為保守的(Conserved)，但要模擬在恆定溫度和壓力下的真實系統並不是很實用，NVE 的函數如下表示：

$$F_{NVE}(N, V, E) \cong [N! \Omega(N, V, E)]^{-1} \iiint dr^N \int dP^N \delta[\mathcal{H}_1(r^N, P^N; V) - E] F(r^N, P^N; V)$$

其中 $\Omega(N, V, E)$ 為

$$\Omega(N, V, E) \cong (N!)^{-1} \iiint dr^N \int dP^N \delta[\mathcal{H}_1(r^N, P^N; V) - E]$$

δ 為衝擊函數， r 為原子座標。

NVT 是典範系統(Canonical)，在固定原子數、系統體積和系統溫度做系統平衡，利用隨機性和動態性並且固定系統動能來讓系統溫度恆定，控制溫度是利用 Nosé-Hoover 的方法，NVT 的函數如下表示：

$$F_{NVT}(N, V, T) \cong [N! Q(N, V, T)]^{-1} \iiint dr^N \int dP^N \exp\left(\frac{-\mathcal{H}_1(r^N, P^N; V)}{kT}\right) F(r^N, P^N; V)$$

其中 $Q(N, V, T)$ 為

$$Q(N, V, T) \cong (N!)^{-1} \iiint dr^N \int dP^N \exp\left(\frac{-\mathcal{H}_1(r^N, P^N; V)}{kT}\right)$$

NPT 是恆溫恆壓系統(Isothermal-isobaric)，在固定原子數、系統壓力和系統溫度下做系統平衡，恆定系統溫度和 NVT 相同，而使用 Parinello-Rahman 的方法調節系統體積來達到恆定壓力，並且每次計算後利用 Berendsen 或 Gaussian constraints 的方法回復系統壓力，NPT 適用於模擬箱(simulation box)有體積變化的模擬，NPT 函數如下表示：

$$F_{NPT}(N, P, T)$$

$$\cong [N! \Delta(N, P, T)]^{-1} \int_0^\infty dV \iiint dr^N \int dP^N \exp \left(\frac{-[PV + \mathcal{H}_1(r^N, P^N; V)]}{kT} \right) F(r^N, P^N; V)$$

其中 $\Delta(N, P, T)$ 為

$$\Delta(N, P, T) = (N!)^{-1} \int_0^\infty dV \iiint dr^N \int dP^N \exp \left(\frac{-[PV + \mathcal{H}_1(r^N, P^N; V)]}{kT} \right)$$

NpH 是恆壓恆焓系統(Isobaric-isenthalpic)，在固定原子數、系統力和系統的焓下做系統平衡，和 NPT 相同使用 Parinello-Rahman 的方法來恆定壓力，NpH 函數如下表示：

$$F_{NPH}(N, P, H)$$

$$= [N! \mathcal{T}(N, P, H)]^{-1} \int_0^\infty dV \iiint dr^N \int dP^N \delta[\mathcal{H}_1(r^N, P^N; V) - PV - H] F(r^N, P^N; V)$$

其中 $\mathcal{T}(N, P, H)$ 為

$$\mathcal{T}(N, P, H) = (N!)^{-1} \int_0^\infty dV \iiint dr^N \int dP^N \delta[\mathcal{H}_1(r^N, P^N; V) - PV - H]$$

2.1.4 週期性邊界

週期性邊界條件(Periodic Boundary Conditions, PBC)，在分子動力模擬中是用來避免因為有限尺寸所引起的邊界效應問題。此方法能使系統有如無限邊界系統，唯一的缺點是有可能發生的週期性效應[90, 91]。週期性邊界條件的代表意義為，當有任何原子從系統邊界右面離開時，就會有相同的原子從系統邊界的左面進入系統中。在圖 2-3 中，我們可以看到當有粒子從一面系統邊界離開時，就會有一粒相同的粒子從另一面進入系統中。

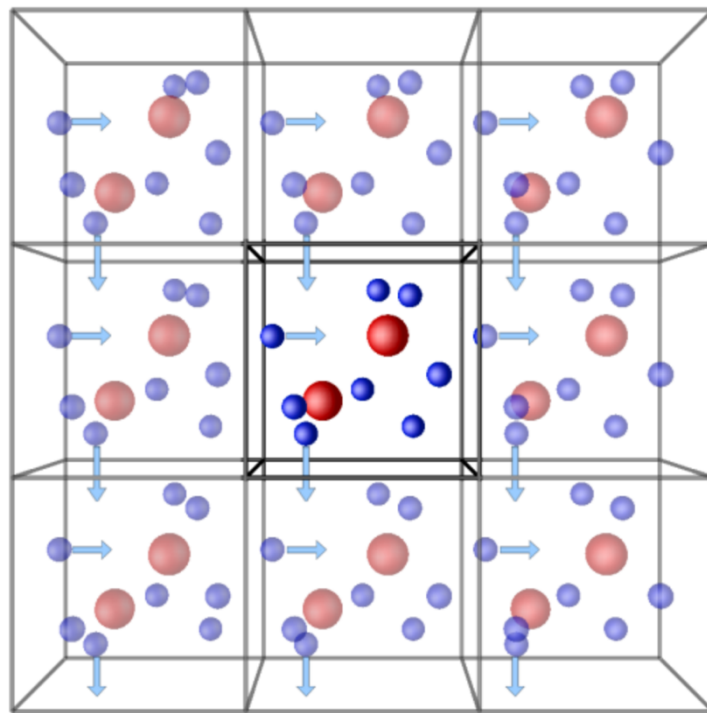


圖 2-3 週期性邊界示意圖(<http://isaacs.sourceforge.net/phys/pbc.html>)。

2.2 模型介紹

2.2.1 膠原蛋白分子模型

本研究使用 *mus musculus* (wild type mouse) 中 type I alpha-1 與 type I alpha-2 的實際序列來建立膠原蛋白模型，其中正常的膠原蛋白將由兩條 alpha-1 與一條 alpha-2 所組成，而 brittle bone 的膠原蛋白將由三條 alpha-1 所組成，本研究使用 NCBI protein database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) 中的序列 AAH50014.1 for alpha-1 chain 以及 NP_031769.2 for alpha-2 chain.

alpha-1 的序列為：

MFSFVDLRLLLLLLGATALLTHGQEDIPEVSCIHNGLRVPNGETWKPEVCLICICH
NGTAVCDDVQCNEELDCPNPQRREGECCAFCEEYVSPNSEDVGVEGPKGDGP
PQGPRGPVGPPGRDGIPGQPGLPGPPGPPGPPGPPGLGGNFASQMSYGYDEKSA
GVSVPGPMGPSGPRGLPGPPGAPGPQGFGPPGEPGEPGGSGPMGPRGPPGPPG
KNGDDGEAGKPRPGERGPPGPQGARGLPGTAGLPGMKGHRGFSGLDGAKGD
AGPAGPKGEPGSPGENGAPGQMGRGLPGERGRPGPPGTAGARGNDGAVGAA
GPPGPTGPTGPPGFPGAVGAKGEAGPQGARGSEGPQGVRRGEPGPPGPAGAAGPA
GNPGADGQPGAAGKANGAPGIAGAPGFPGARGPSGPQGSPGPPGPKGNSGEPGA
PGNKGDTGAKGEPGATGVQGPMPAGEEGKRGARGEPGPSGLPGPPGERGGPG
SRGFPGADGVAGPKGPSGERGAPGAPGPKGSPGEAGRPGEAGLPAGKGLTGSPG
SPGPDGKTGPPGPAGQDGRPGPAGPPGARGQAGVMGFPGPKGTAGEPGKAGER
GLPGPPGAVGPAGKDGEAGAQQAGPPAGPAGERGEQGPAGSPGFQGLPGPAGPP
GEAGKPGEQGVPGDLGAPGPSGARGERGFPGERGVQGPMPAGPRGNNGAPGN
DGAKGDTGAPGAPGSQGAPGLQGMPPGERGAAGLPAGPKGDRGDAGPKGADGS
PGKDGARGLTGPIGPPGPAGAPGDKGEAGPSGPPGPTGARGAPGDRGEAGPPGP
AGFAGPPGADGQPGAAGKGEAGPAGTGVKGDAGPPGPAGPAGPPGPIGNVGAAGPKG
PRGAAGPPGATGFPGAAGRVGPPGPSGNAGPPGPPGPVGKEGGKGRGETGPA
GRPGEVGPMPGPPGAGEKGSPPGADGPAGSPGTPGPQGIAGQRGVVGLPGQRGER
GFPGLPGPSGEPGKQGPSGSSGERGPPGPMGPPGLAGPPGESGREGSPGAEGSPG
RDGAPGAKGDRGETGPAGPPGAPGAPGAPGPVGPAGKNGDRGETGPAGPAGPI
GPAGARGPAGPQGPRGDKGETGEQGDRIKGHRGFSGLQGPPGSPGSPGEQGPS
GASGPAGPRGPPGSAGSPGKDGLNGLPGPIGPPGPRGRTGDSGPAGPPGPPGPPG
PPGPPSGGYDFSFLPQPPQEKSQDGGRYRADDANVVRDRDLEVDTTLKSLSQ

QIENIRSPEGSRKNPARTCRDLKMCHSDWKSGEYWIDPNQGCNLDAIKVYCNM
ETGQTCVFPTQPSVPQKNWYISPNPKEKKHVWFGESMTDGFPEYGESESDPAD
VAIQLTFLRLMSTEASQNITYHCKNSVAYMDQQTGNLKKALLLQGSNEIELRGE
GNSRFTYSTLVLDGCTSHTGTWGKTVIEYKTTKTSRLPIIDVAPLDIGAPDQEFGL
DIGPACFV

alpha-2 的序列為：

MLSFVDTRTLLLLAVTSCLATCQYLQSGSVRKGP TGDRGPRGQRPAGPRGRD
GVDGPMGPPGPPGSPGPPGSPAPPGLTGNFAAQYSDKGVSSGP **GPMGLMGPRGP**
PGAVGAPGPQGFQGPAGEPGEPGQTGPAGPRGPAGSPGKAGEDGHPGKPRPG
ERG VVGPPQGARGFP GTPGLPGFKGVKGHSGMDGLKGQPGAQGVKGEPGAPGE
NGTPGQAGARGLPGERGRVGAPGPAGARGSDGSVGPVGPAGPIGSAGPPGFPG
APGPKGELGPVGNP GPAGPAGPRGEVGLPGLSGPVGPPGNPGTNGLTGAKGATG
LPGVAGAPGLPGRGIPGPAGAAGATGARGLVGEPGPAGSKGESGNKGEPGSVG
AQGPPGPSGEEGKRGSPGEAGSAGPAGPPGLRGSPGSRGLPGADGRAGVMGPP
GNRGSTGPAGIRGPNGDAGRPGEPGLMGPRGLPGSPGNVGPSGKEGPVGLPGID
GRPGPIGPAGPRGEAGNIGFPGPKGPSGDPGKPGERGHPLAGARGAPGPDGNN
GAQGP PGPVQGVQGGKGEQGPAGPPGFQGLPGPSGTTGEVKGKPGERGLPGEFGL
PGPAGPRGERGTPGESGAAGPSGPIGSRGPSGAPGPDGNKGEAGAVGAPGSAGA
SGPGGLPGERGAAGIPGGKGEKGETGLRGDTGNTGRDGARGIPGAVGAPGPAG
ASGDRGEAGAAGPSGPAGPRGSPGERGEVGPAGPNGFAGPAGAAGQPGAKGEK
GTKGPKGENGIVGPTGSVGAAGPSGPNGPPGPVGSRGDGGPPGMTGFPGAAGR
TGPPGPSGIAGPPGPPGAAGKEGIRGPRGDQGPVGR TGETGASGPPGFVGEKGPS
GEPGTAGAPGTAGPQGLLGAPGILGLPGSRGERGLPGIAGALGEPGPLGISGPPG
ARGPPGAVGSPGVNGAPGEAGRDGNPGSDGPPGRDGQP GHKGGERGYPGSIGPT
GAAGAPGPHGSVGPAGKHGNRGEPGPAGSVGPVGAVGPRGPSGPQGIRGDKGE
PGDKGHRGLPGLKGYSGLQGLPGLAGLHGDQGAPGPVGPAGPRGPAGPSGPVG
KDGRSGQPGPVGPAGVRGSQGSQGPAGPPGPPGPPGPPGVSGGGYDFGFEGDF
YRADQPRSQPSLRPKDYEV DATLKS LNNQIETLLTPEGSRKNPARTCRDLRLSHP
EWNSDYYWIDPNQGCTMDAIKVYCDFSTGETCIQAQPVNTPAKNSYSRAQANK
HVWLGETINGGSQFEYNVEGVSSKEMATQLAFMRLLANRASQNITYHCKNSIA
YLDEETGSLNKAVLLQGSNDVELVAEGNSRFTYSVLVDGCSKKTNEWGKTIIEY
KTNKPSRLPFLDIAPLDIGGADQEF RVEVGPVCFK

其中紅色字體表示三股螺旋膠原蛋白的區域。

2.2.2 膠原蛋白分子間的交聯鍵建立

本研究以原始的膠原蛋白模型為基礎上進行建立，加上交聯鍵來建立新的模型。我們以開放軟體亞佛加厥 (Avogadro)，CHARMM General Force Field (CGenFF) 以及伊利諾大學香檳分校(uiuc)所開發的分子動力模擬可視化軟體 Visual Molecular Dynamics(VMD)來進行建立，最後以分子動力模擬軟體 LAMMPS 來進行模擬。其主要流程如下圖 2-4 所示：

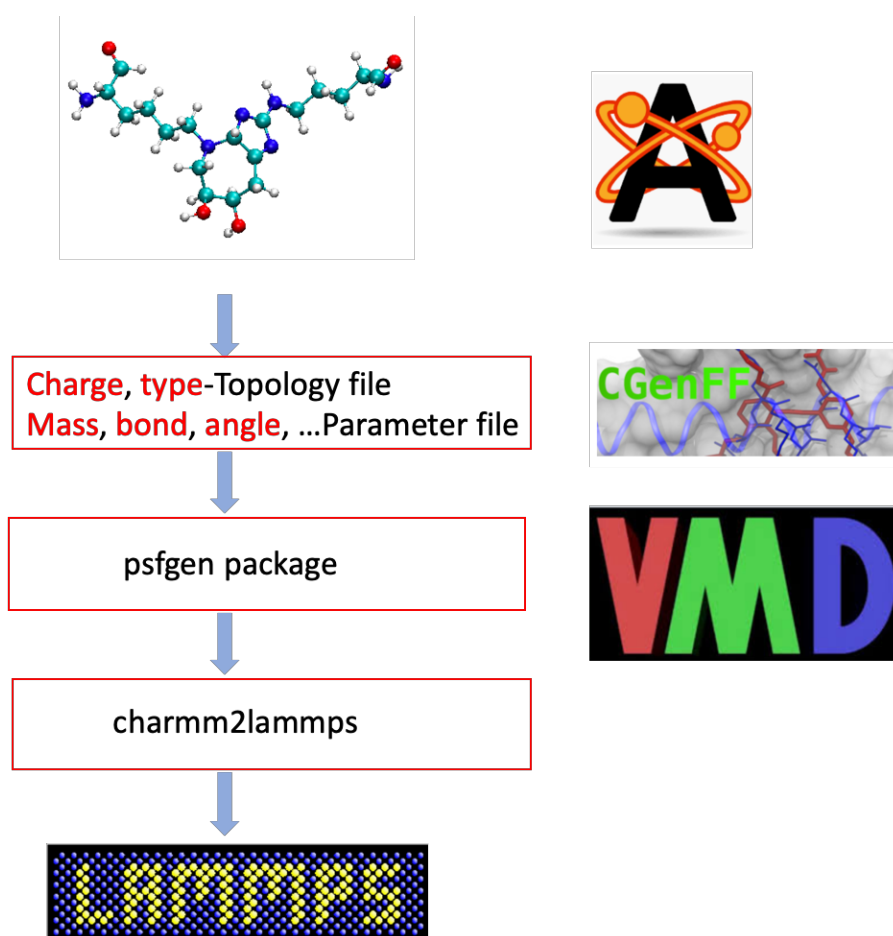


圖 2-4 交聯鍵模型建立流程圖

首先選定要鍵結的交聯建型態，第一步在 Avogadro 軟體中建立分子的結構，並進行能量最小化找出結構穩定的狀態輸出成.pdb 的檔案。

第二步把輸出的 pdb 檔案上傳至 CHARMM General Force Field 的網站上，網站會找出相似的結構，並輸出參數，這些參數包含 type、charge、bond、angle、dihedral 和 improper，用來添加或修改 topology 和 parameter 的檔案，由於本研究選擇的交聯鍵形式不帶電，我們在 charge 的地方進行電荷平衡，讓交聯鍵處於點中性的狀態。

第三步把修改後的 topology 檔案和.pdb 檔案用 VMD 的 psfgen packagen 的 patch 指令來進行修改，這個步驟必須要自行編輯.tcl 檔案完成，最後會輸出修改後的.pdb 檔案和.psf 檔案。

第四步用轉換格式的程式 charmm2lammps 來把我們的.pdb、.psf、topology 和 parameter 整合起來輸出成一個以 charmm force field 為基礎的.data 檔案。最後我們用.data 檔案的模型來進行模擬。

2.2.3 模型資訊

我們總共建立四種不同類型的模型如表 2-1 所示，第一種只有單純膠原蛋白分子，我們命名為 Normal，第二種在 N，C 端連接兩條 deH_LNL crosslink，我們命名為 deH22，第三種在 N，C 端連接四條 deH_LNL crosslink，我們命名為 deH44，最後第四種是 AGEs crosslink 我們命名為 AGEs。

Model	Crosslink sites
Normal	NaN
deH22	LYS ¹⁰⁵⁷ -LYS ¹⁹⁹⁶ ,LYS ²⁰⁸⁹ -LYS ³⁰²⁶
deH44	LYS ¹⁰⁵⁷ -LYS ¹⁹⁹⁶ ,LYS ²⁰⁸⁹ -LYS ³⁰²⁶ , LYS ¹⁰³ -LYS ¹⁰⁴⁶ ,LYS ¹¹⁵⁰ -LYS ³¹²⁶
AGEs	LYS ⁴⁵⁰ -ARG ¹⁹⁶⁹ ,LYS ¹⁰³ -ARG ⁸⁰⁵ ,LYS ⁵⁴⁷ -ARG ¹³⁵⁴

表 2-2 為各模型 crosslink 接點位置

交聯的質量密度大小由高而低分別為：deH44 > AGEs > deH22 > Normal，deH22 和 deH44 的交聯形式為 dehydro-lysino-norleucine 在膠原蛋白連接的位置主要在 N，C 兩端，而 AGEs 的交聯形式為 Glucosepane 接點位置膠原蛋白分子內，如圖 2-5 所示。

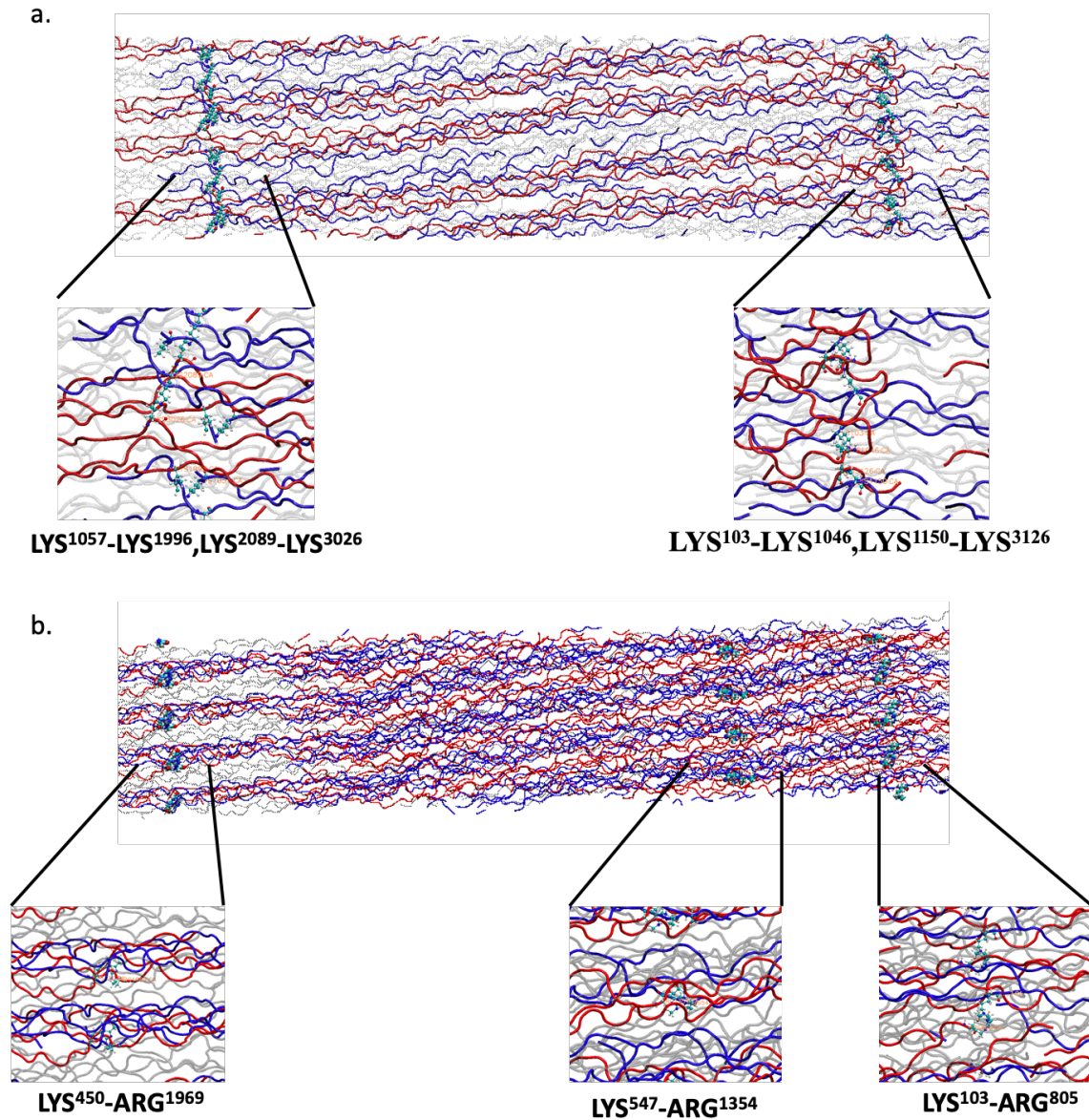


圖 2-5 交聯鍵接點位置示意圖(a.) dehydro-lysino-norleucine crosslink 的接點

(b.) Glucosepane crosslink 的接點位置

2.2.4 模擬的設置及環境條件

先前的研究發現膠原蛋白分子因為堆疊的關係，會形成重疊區和空隙區域，而重疊區和空隙區域在膠原蛋白分子上會週期性的循環，我們定義它為 D-period。D-period 的長度約是 67nm，由重疊區與空隙區域所組成[92-94]，單一膠原蛋白分子總共有五個重疊區域以及四個空隙區域，如圖 2-6 所示。

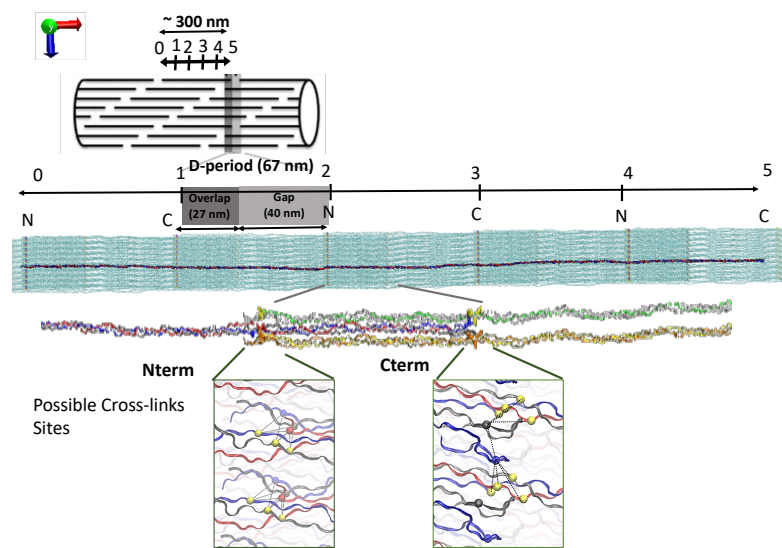


圖 2-6 為膠原蛋白纖維示意圖。

本研究模型的設置參考 D-period 的週期特性，將模擬的邊界視為一個 D-period 的單位元 (unit cell)，利用週期性邊界 (PBC) 以及模擬箱(simulation box)作為系統的設置來模擬出膠原蛋白纖維的行為。

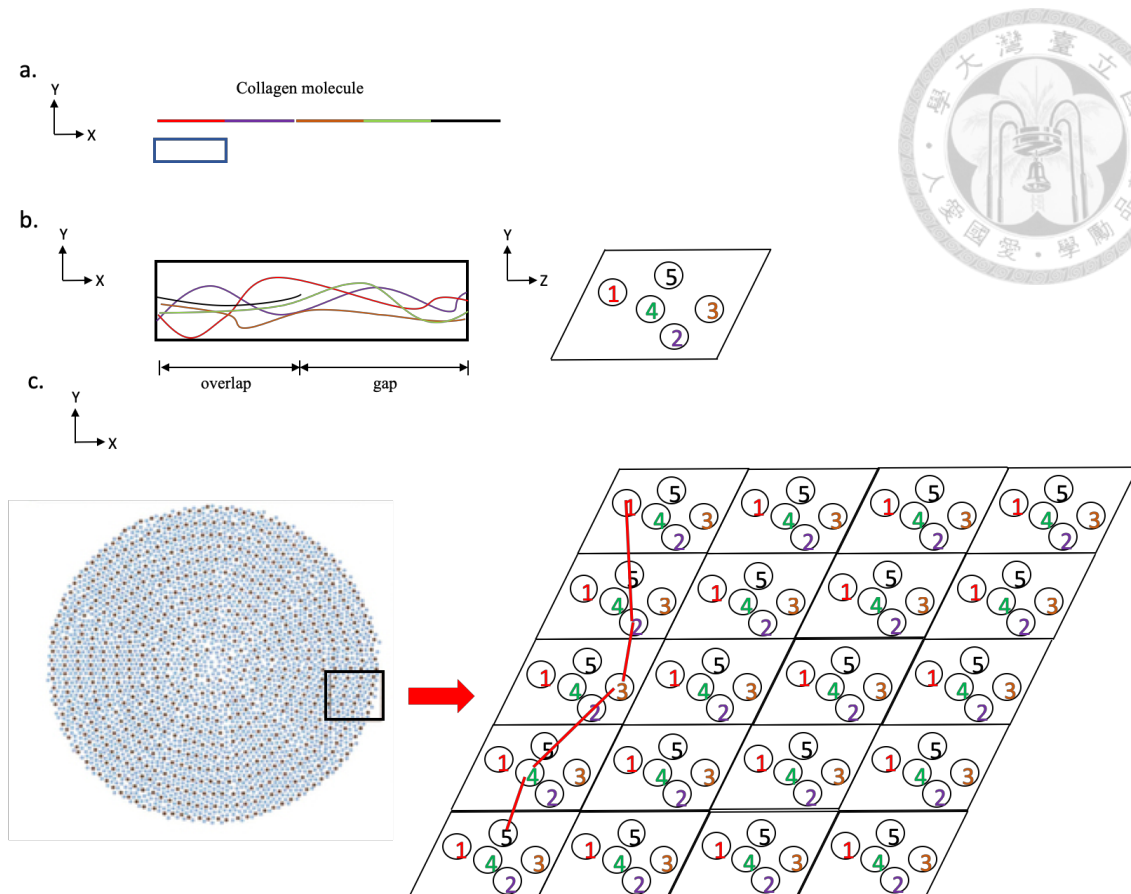


圖 2-7 週期性邊界效應下，膠原蛋白纖維模型示意圖。

圖 2-7 (a.)為膠原蛋白分子和模擬盒子的邊界(b)利用 VMD 裡面 pbc wrap 指令，考慮 pbc 效應且把所有分子集中在盒子中(c.)在 pbc 的效應下，膠原蛋白分子在纖維中的位置。也就是說，在 pbc 的情況下，我的 unit cell 會同時擁有五條膠原蛋白分子，最後會形成膠原蛋白纖維。模擬的環境主要用 NPT 之系統，使用 CHARMM 力場來模擬膠原蛋白，在固定溫度 310k 條件下進行模擬，並給予 1atm 以及 60MPa 兩種不同的情況來觀察不同的力學行為及結構特性。



2.3 分析方法

2.3.1 方均根偏移(root-mean-square deviation)分析

方均根偏移(RMSD)為在一個時間序下，每一個時間的原子座標對於初始的原始座標做方均根誤差，其公式如下：

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - x_0)^2 + (y_i - y_0)^2 + (z_i - z_0)^2}$$

其中 N 為總原子數。在計算 RMSD 前必須將分子的質心和初始分子質心做對齊(align)，這樣才會除去分子位移所造成的誤差，讓 RMSD 可以代表分子結構穩定。在本研究中，我們透過方均根偏移來分析結構是否處於平衡以及結構的穩定性，最後可以決定我們的分析樣本，在分析區間內，標準差不得超過 1Å，在平衡狀態下，RMSD 的大小在我們的模型代表著到平衡所需要的位移量，RMSD 越大，到平衡的位移量越多，相反的越小越少。本研究利用 VMD 中 measure 指令，fit 用來計算不同時序下質心的距離，再用 measure rmsd 用來計算 rmsd 距離。

2.3.2 Unit cell 長度分析

Unit cell 模擬實系統的邊界，因為本研究使用 NPT 系統會有體積的變化，並且 unit cell 的只有 x 軸有變化 y、z 軸不太變化，所以 x 的變化及為體積變化，而 x 軸方向的長度為 D-period。D-period 會影響 overlap 和 gap 的總長度以及分子總長度，除此之外，因為 NPT 系統恆定壓力的關係，unit cell 的 x 軸長度越小代表原始模型系統壓力較小，反之長度越大，原始模型系統壓力越大。

2.3.3 頭尾端距(end to end distance)分析

頭尾端距為一個常用來描述聚合物構象的參數。主要是測量聚合物分子頭尾兩端的距離，以表示聚合物的撓度。本研究用來分析膠原蛋白分子長度的變化，選取膠原蛋白的 alpha-1 chain 第一個殘基(resid 1)以及最後一個殘基(resid 1054)的 alpha carbon 做為邊界的頭尾端，如圖 2-8 所示。

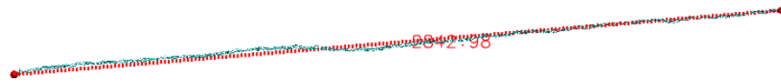


圖 2-8 膠原蛋白分子頭尾端距示意圖。

2.3.4 overlap and gap 分析

我們在計算 overlap 和 gap 的長度，是利用膠原蛋白纖維堆疊的規律性 D-period 來算。首先我們先把分子頭尾兩端最大長度算出來，再來取得當下 unit cell 的長度來當作 D-period 的長度，最後獲得長度為：

$$\text{Overlap} = \text{molecule length} - (4 \times \text{Dperiod})$$

$$\text{Gap} = \text{Dperiod} - \text{overlap}$$

最後算出來 overlap 和 gap 得到距離後，我們可以依據距離來對氨基酸殘基分佈作分析。

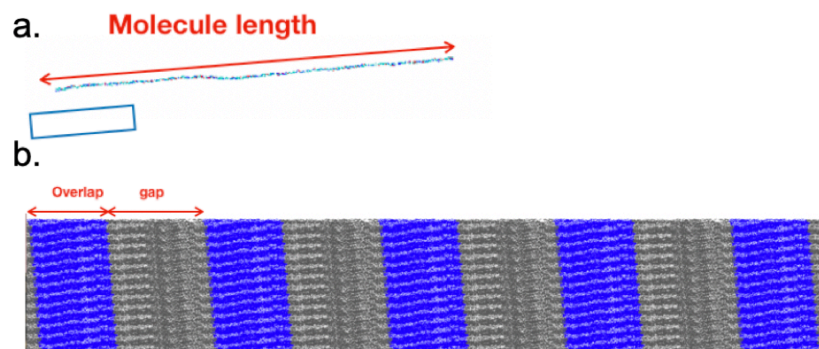


圖 2-9(a.)為計算 overlap 和 gap 示意圖，而(b.)則依據所算之 overlap 和 gap 長度，所劃分出的區域。

由 overlap 和 gap 的分析可以觀察分子間有無滑動，利用算出來的 overlap 和 gap 長度做不同應力下的 overlap 和 gap 的比例以及長度的變化，再對 alpha1-1 的氨基酸殘基做劃分，依照相同應力在不同模型下進行分析，來比較不同交聯鍵對於纖維滑動的影響。

2.3.5 Unit height and radius 分析

膠原蛋白分子由三條鏈所組成，具有特殊的三股螺旋結構，其中每一條鏈的胺基酸序列每三個胺基酸為一個 Gly，因此具有相當獨特的(Gly-X-Y)_n重複性，其中 X 與 Y 代表不同的胺基酸序列，由於此一特別的序列特徵，本研究團隊發展了一個利用 Gly 的空間座標來分析膠原蛋白分子結構的方法，在此方法中，我們利用每一個 Gly 的 alpha carbon 原子來描述膠原蛋白分子結構。

假設 $\mathbf{r}_i$ 為膠原蛋白分子中第 i 個 Gly 的 alpha carbon 原子，首先我們計算三條鏈中的 Gly 之 alpha carbon 原子的質心為 $\mathbf{b}_i = \frac{1}{3}(\mathbf{r}_i + \mathbf{r}_{i+1} + \mathbf{r}_{i+2})$ ，利用此定義我們可以計算此膠原蛋白分子的 contour length 為：

$$L_c = \sum_{i=1}^{n-1} \|\mathbf{b}_{i+1} - \mathbf{b}_i\|$$

其中 n 代表所有質心的總數，由膠原蛋白分子的長度所決定， L_c 為 contour length，同時此分子的 end-to-end distance 可以由此分子的 N 與 C terminal 所決定：

$$\|\mathbf{b}_n - \mathbf{b}_1\|。$$

為了更進一步了解胺基酸序列對膠原蛋白分子局部結構的影響，我們進一步計算相鄰質心 $\mathbf{b}_i$ 的距離為：

$$d_i = \|\mathbf{r}_{i+1} - \mathbf{r}_i\|$$

進一步定義 $\mathbf{r}_i^A$, $\mathbf{r}_i^B$, 與 $\mathbf{r}_i^C$ 為鏈 A, B, 與 C 中第 i 個 Gly 的 alpha carbon 原子 ($\bar{\mathbf{r}}_i = \frac{1}{3}(\mathbf{r}_i^A + \mathbf{r}_i^B + \mathbf{r}_i^C)$)，由於膠原蛋白分子中三條鏈交錯排列，我們有 $\mathbf{r}_i^A = \mathbf{r}_{3i-2}$, $\mathbf{r}_i^B = \mathbf{r}_{3i-1}$ 與 $\mathbf{r}_i^C = \mathbf{r}_{3i}$ 的關係，而膠原蛋白分子的 unit height 可以由 $h_i = \|\bar{\mathbf{r}}_{i+1} - \bar{\mathbf{r}}_i\|$ 。

膠原蛋白分子三股螺旋結構的轉軸可以透過求解通過 $\bar{\mathbf{r}}_i$ 的 3d natural interpolating cubic spline curve 求得。得到三股螺旋結構的轉軸後，我們便可計算



$\mathbf{r}_i^A$, $\mathbf{r}_i^B$, 與 $\mathbf{r}_i^C$ 到轉軸的距離並平均求得膠原蛋白分子局部的分子半徑。

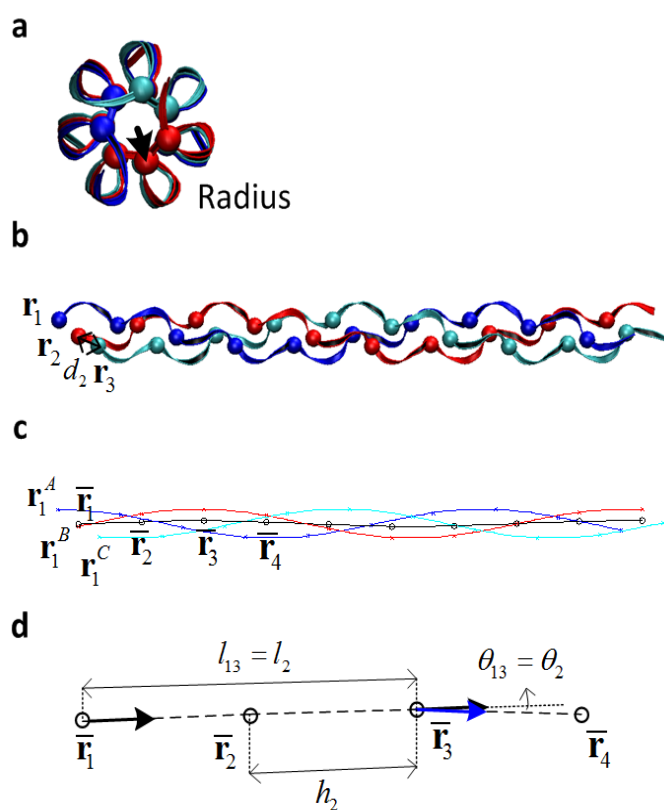


圖 2-10 膠原蛋白分子結構分析[95]

圖 2-10 (a)膠原蛋白分子截面示意圖，圖中同一條鏈以同一顏色表示，圓球表示每一個 Gly 的 alpha carbon 原子，(b)膠原蛋白分子側面圖，(c)本研究利用 Gly 中 alpha carbon 的資訊來分析膠原蛋白分子之結構，(d)膠原蛋白分子之 unit height 計算。

2.3.6 Hydrogen bond 分析

氫鍵是分子間作用力的一種，是一種永久偶極之間的作用力，作用在 O-H 或 O-N 並產生特定距離及角度的鍵結，本研究利用 VMD 的套件計算 hydrogen bond，距離取 3.5 Angstrom，角度取 30.0°，如圖 2-11 所示。

在膠原蛋白分子內的氫鍵連接可能是氨基酸主鏈相接，也有可能是同條氨基酸鏈上相鄰氨基酸相連，主鏈相連的氫鍵是穩定三股螺旋結構的氫鍵，而鄰近相連的氫鍵則是穩定螺旋結構的氫鍵。本研究氫鍵的分析主要分為在樣本時間內所發生的氫鍵分析和氫鍵分類的分析，前者的分析方式是在樣本時間內，把出現機率

50%以上的氫鍵機率相加，而後者是針對上述主鏈相連和鄰近相連做分類。

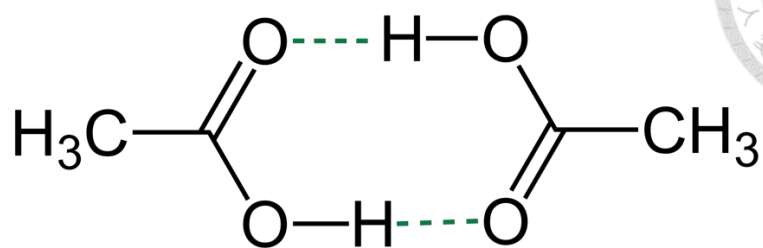


圖 2-11 氫鍵示意圖。

第3章、交聯鍵在膠原蛋白纖維到分子的影響

3.1 纖維尺度

3.1.1 方均根偏移分析

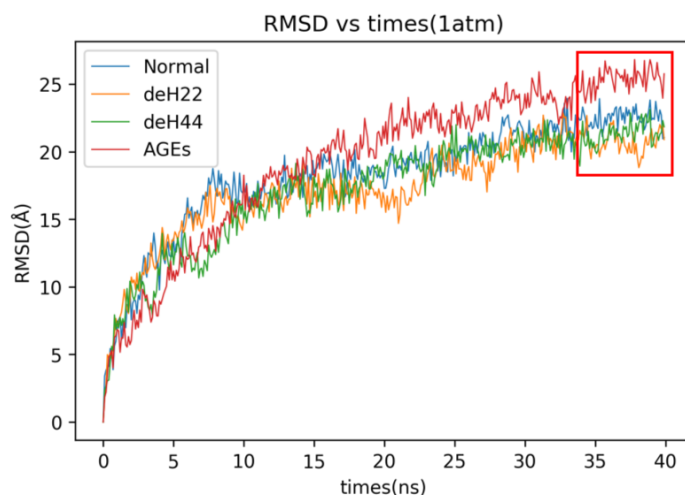


圖 3-1 在 1atm 下的 RMSD 分析

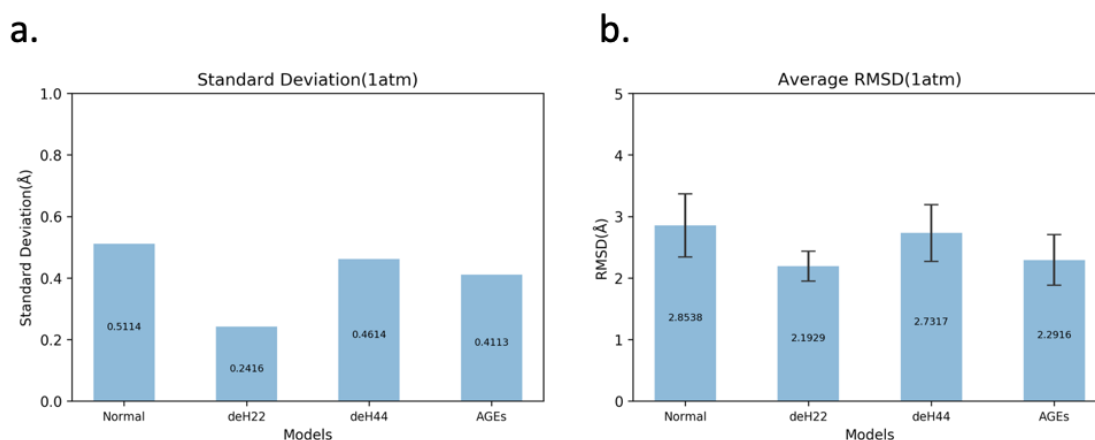


圖 3-2 樣本時間 35ns~40ns 中，(a.)RMSD 的 Standard deviation(b.)平均的 RMSD。

先分析 1atm 下的結果，由結果看到在平衡的過程中，各個模型的數值趨近定值，代表模型在 1atm 下趨於平衡，如圖 3-1 所示，本研究取紅色區域 35ns~40ns 的時間範圍共 5ns 來作為分析樣本，透過 RMSD 標準差是否在 1 Å 之內來判斷模型是否平衡，如圖 3-2 (a.)所示，四個模型都屬於平衡狀態。在這 5ns 中 RMSD 標準差大小為：Normal > deH44 > AGEs > deH22。

再來把這 5ns 的 RMSD 做平均如圖 3-2(b.)所示，發現 Normal 為 2.85 ± 0.51 最

高，其次為 deH44 的 2.73 ± 0.46 ，再來 AGEs 的 2.29 ± 0.41 ，最後是 deH22 的 2.19 ± 0.24 ，由結果看到 deH22 模型在這 5ns 中穩定性相較於其他三者來得高，而 Normal 得穩定性較差。

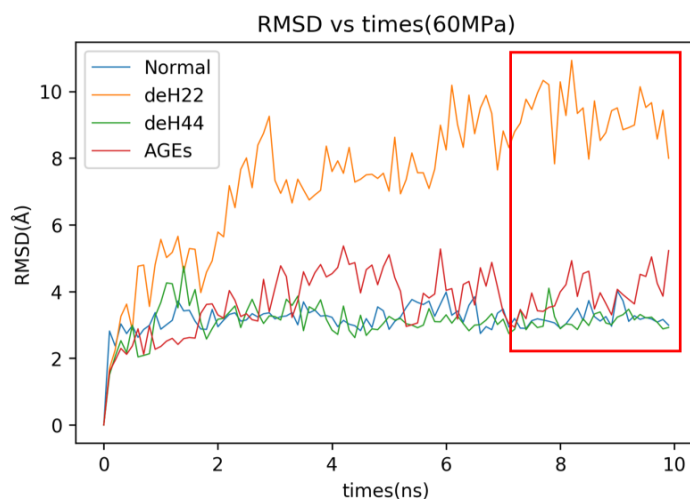


圖 3-3 在 60MPa 下的 RMSD 分析

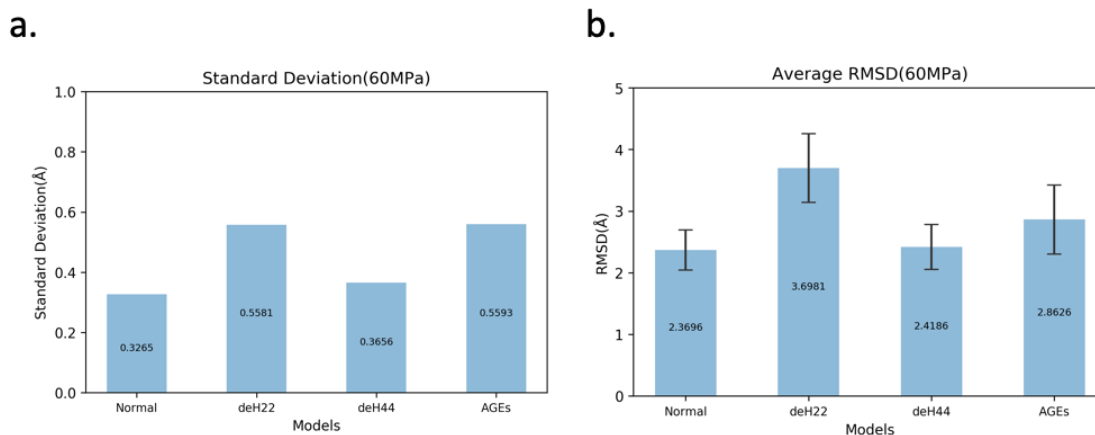


圖 3-4 樣本時間 7ns~10ns 中，(a.)RMSD 的 Standard deviation(b.)平均的 RMSD。

接下來分析 60MPa 下的結果，由結果看到在平衡的過程中，各個模型的數值趨近定值，代表模型在 1atm 下趨於平衡，如圖 3-3 所示，本研究取紅色區域 7ns~10ns 的時間範圍共 3ns 來作為分析樣本，透過 RMSD 標準差是否在 1 Å 之內來判斷模型是否平衡，如圖 3-4 (a.)所示，四個模型都屬於平衡狀態，確認都在平衡穩定的狀態。在這 3ns 中標準差大小為：AGEs > deH22 > deH44 > Normal。再來把這 3ns 的 RMSD 做平均如圖 3-4 (b.)所示，發現 deH22 為 3.69 ± 0.55 最高，其次



為 AGEs 的 2.86 ± 0.55 ，再來 deH44 的 2.41 ± 0.36 ，最後是 Normal 的 2.36 ± 0.32 ，Normal 和 deH44 在這 3ns 中，結構穩定性都比另外兩者高。

3.1.2 Unit cell 長度分析

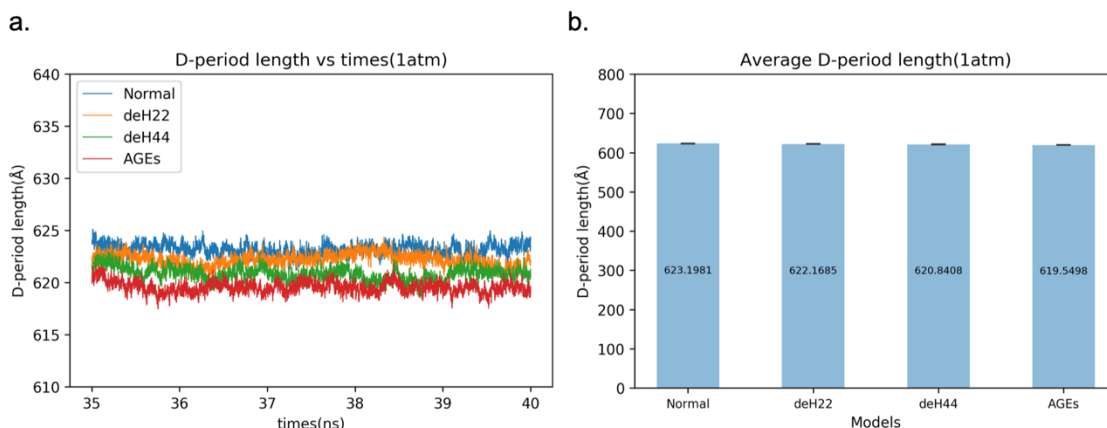


圖 3-5 在 1atm 下，(a.) D-period 的長度變化(b.)D-period 的平均長度。

首先分析在 1atm 下的結果，由結果發現 D-period 的長度已經趨於平衡如圖 3-5 (a.)所示，再來看平均 D-period 的長度如圖 3-5(b.)，由結果發現 Normal 為 623.19 ± 0.56 最高，其次為 deH22 的 622.16 ± 0.63 ，再來 deH44 的 620.84 ± 0.653 ，最後是 AGEs 的 619.54 ± 0.57 。

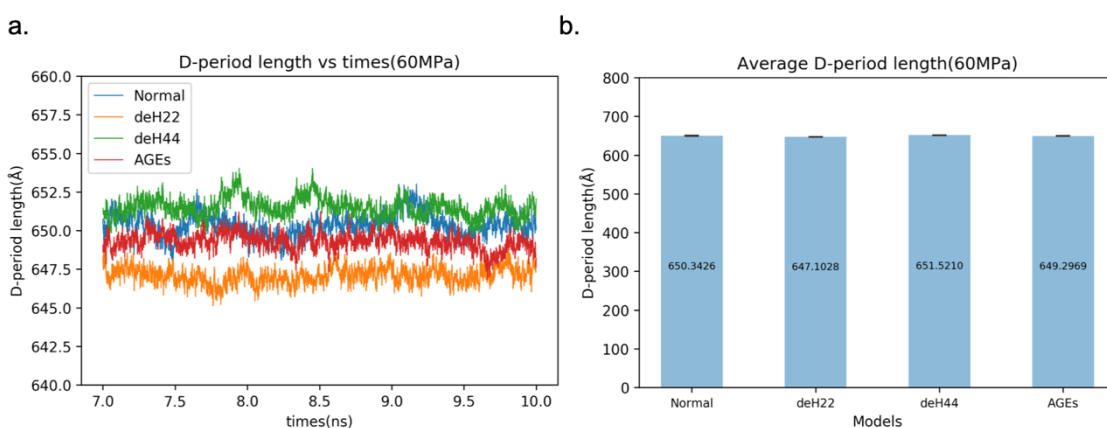


圖 3-6 在 60MPa 下，(a.)D-period 的長度變化(b.)D-period 的平均長度。

再來分析 60MPa 下個模型的結果，由結果看到數值趨近於穩定如圖 3-6 (a.)所示，再來看平均 D-period 的長度如圖 3-6 (b.)所示，由結果發現 deH44 為 651.52 ± 0.64



最高，其次為 Normal 的 650.34 ± 0.74 ，再來 AGEs 的 649.29 ± 0.57 ，最後是 deH22 的 619.54 ± 0.56 。

3.1.3 分子頭尾端距分析

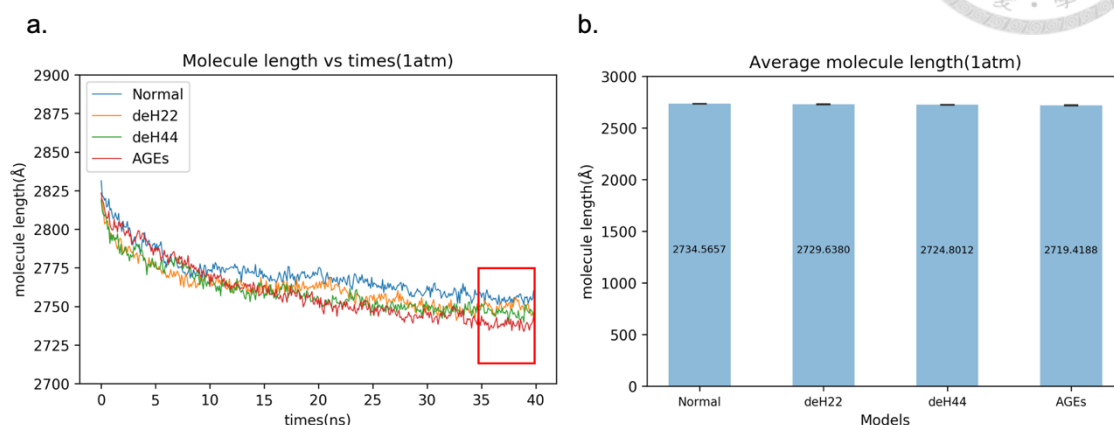


圖 3-7 在 1atm 下，(a.)分子頭尾端距的變化(b.)平均分子的頭尾端距。

首先先分析模型在 1atm 情況下的表現，我們取樣本時間的 5ns 平衡段來分析如圖 3-7 (a.)所示，由結果觀察到在這段時間內，長度趨於穩定，也驗證我們 RMSD 取的區段為穩定平衡，再來分析這段區間的平均長度如圖 3-7 (b.)所示，由結果發現 Normal 為 2734.56 ± 2.31 最高，其次為 deH22 的 2729.63 ± 2.84 ，再來 deH44 的 2724.80 ± 2.47 ，最後是 AGEs 的 2719.41 ± 2.37 。在沒受力的情況下，沒有交聯鍵的 Normal 模型主要是單獨分子形成平衡，而 deH22 和 deH44 在平衡的過程中，因為 C，N 兩端的交聯鍵作用，讓膠原蛋白分子視為串連的結構，讓分子與分子間互相影響，並且隨著交聯鍵質量密度的越高，影響的程度也越大，會讓膠原蛋白分子越短，而 AGEs 的交聯鍵在分子中，概念像是並聯，影響的程度會大於 deH22 和 deH44。

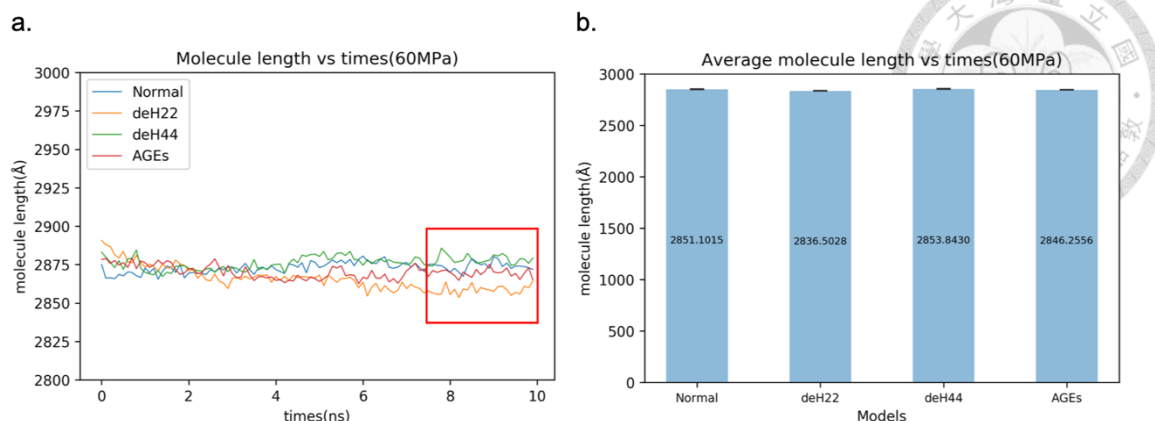


圖 3-8 在 60MPa 下，(a.)分子頭尾端距的變化(b.)平均分子的頭尾端距。

再來分析在 60MPa 下，我們取樣本時間的 3ns 平衡段來分析如圖 3-8 (a.)，發現長度趨於穩定，驗證我們 RMSD 取的區間是穩定平衡的，再來分析這段區間的平均長度如圖 3-8 (b.)所示，我們發現 deH44 為 2853.84 ± 2.84 最高，其次為 Normal 的 2851.10 ± 2.65 ，再來 AGEs 的 2846.25 ± 2.78 ，最後是 deH22 的 2836.50 ± 2.59 ，由結果顯示 deH44 在 60MPa 有最大的伸長量和拉伸的力有效傳導有關，AGEs 在分子內的類似並聯的交聯鍵也有效地讓應力應變有效傳遞，deH22 在 N，C 兩端的交聯鍵密度不高，力量無法有效傳遞下，為伸長量最短的模型，而 Normal 模型在沒有交聯鍵的情況下應力無法有效的傳給鄰近分子，還可以有第二長的長度，所以我們進一步分析伸長量，應變如圖 3-9 所示。

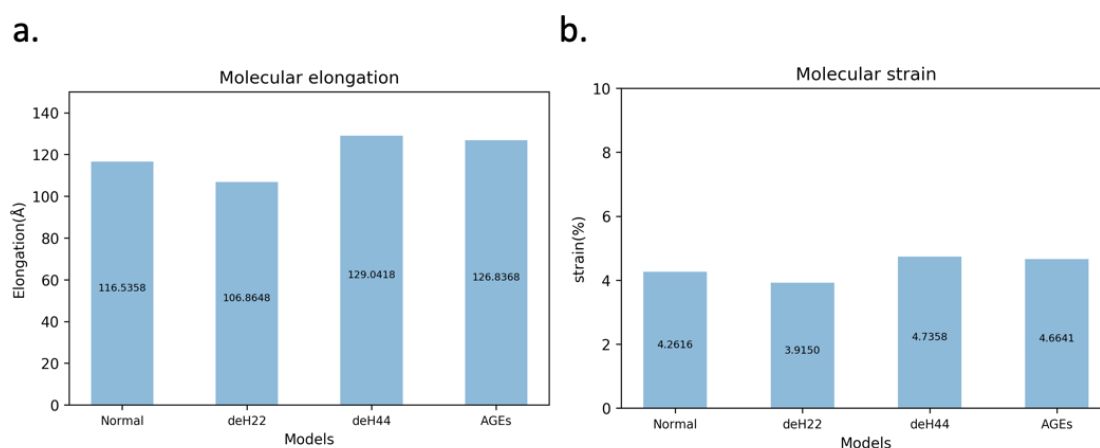
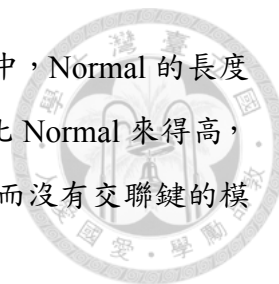


圖 3-9(a.)1atm-60MPa 之伸長量(b.)1atm-60MPa 之應變。

分析伸長量，deH44 為 129.04 最高，其次為 AGEs 的 126.83，再來為 Normal

的 116.53，最後是 deH22 的 106.86，雖然在 60MPa 的平衡長度中，Normal 的長度比 AGEs 和 deH22 來得長，但是在伸長量以及應變中，AGEs 都比 Normal 來得高，說明如果應力持續上升，交聯鍵傳遞應力的能力也會更為明顯，而沒有交聯鍵的模型可能會是最短的模式



3.1.4 Overlap and gap 分析

首先分析個模型在 1atm 下的 overlap/gap ratio，如圖 3-10 所示。

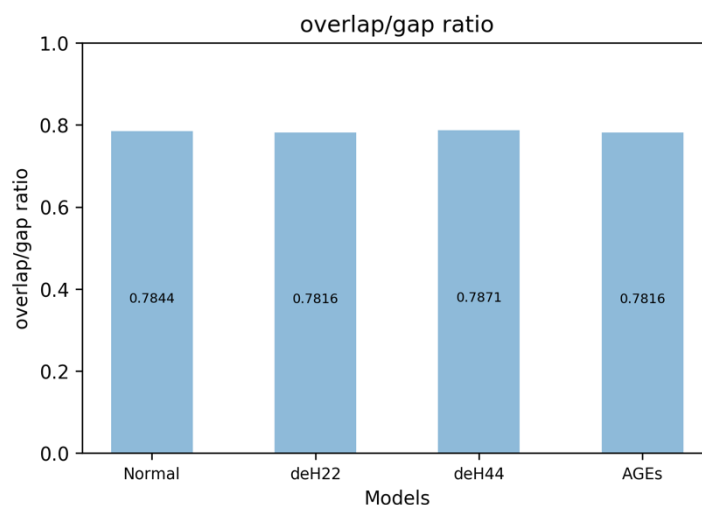


圖 3-10 在 1atm 下，各個模型的 overlap/gap ratio。

由結果看到 overlap/gap ratio 在 1atm 下其實是差不多的，說明在無外力下 overlap 和 gap 分佈的比例不會受到交聯鍵的影響。接下來分別分析在 1atm 下 overlap 和 gap 的長度，如圖 3-11 所示。

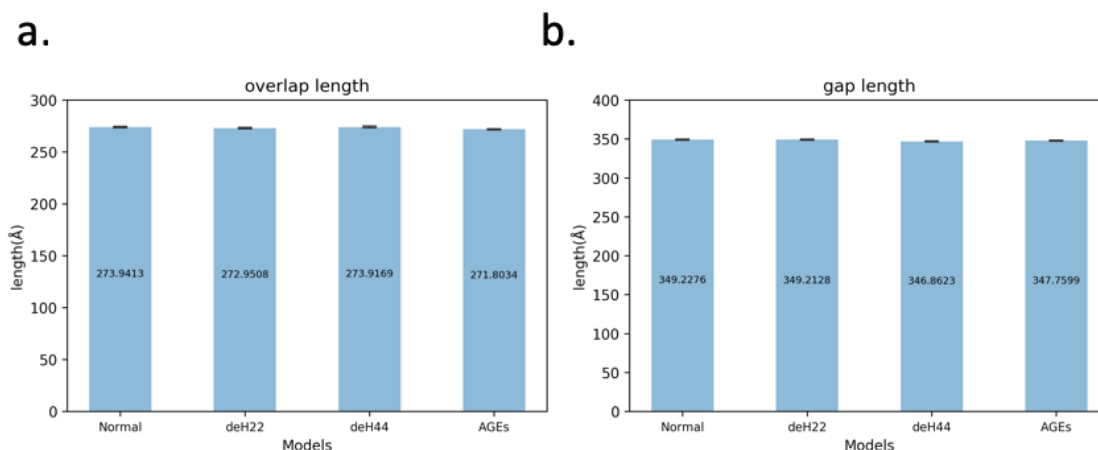


圖 3-11 在 1atm 下，(a.)overlap 平均長度及(b.)gap 的平均長度。



由結果看到在 overlap 的長度中，Normal 和 deH44 是差不多長的，Normal 是 273.94、deH44 是 273.91，再來是 deH22 的 272.95，最短的是 AGEs 的 271.80，而在 gap 的長度中，Normal 和 deH22 是差不多長的，Normal 是 349.22、deH22 是 349.21，再來是 AGEs 的 347.75，最短的是 deH44 的 346.86。

在沒有受力的情況下，Normal 不管是在 overlap 還是 gap 都是最長的，我們可以把 Normal 的模型和其餘的模型做比較，分析交聯鍵對膠原蛋白纖維堆疊的影響，在 deH22 的 overlap 比較短，而 gap 是差不多長的，在 deH44 則是 overlap 是差不多的但 gap 較短，而 AGEs 在 overlap 和 gap 都是較短的。

接下來以上述的 overlap 和 gap 長度來對膠原蛋白分子中 alpha1-1 鏈的氨基酸殘基在 1atm 下做區域的分類，如圖 3-12 所示。

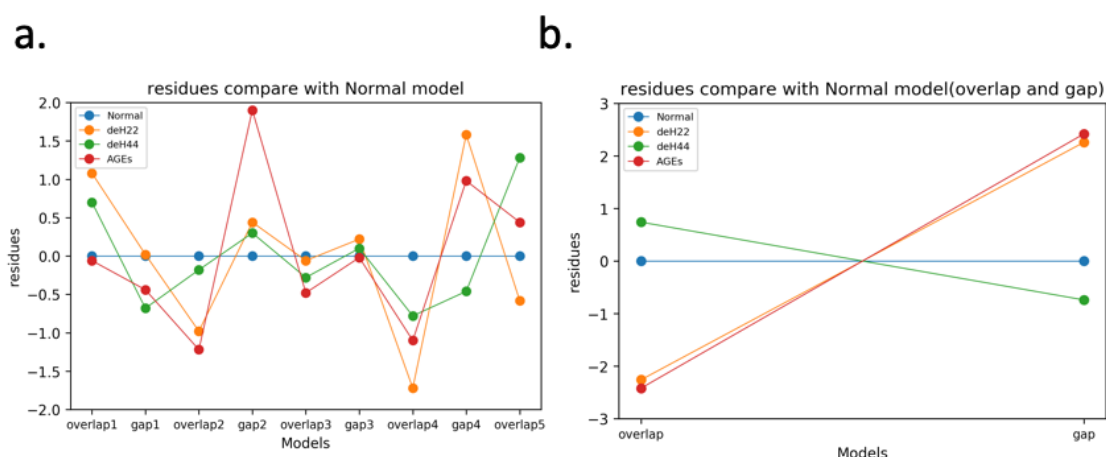


圖 3-12 在 1atm 下，(a.)各區段氨基酸殘基的差值，(b.)overlap 和 gap 氨基酸殘基的差距。

由結果可以看到交聯鍵會影響膠原蛋白分子的氨基酸殘基的分佈，圖 3-12(a.)分佈顯示，雖然 overlap 和 gap 的長度在單一模型中是固定的，但是所分佈氨基酸殘基的數目是不同的，也可以說每段的結構也不同，再來是不同交聯鍵的狀況下分佈也不同，交聯鍵的位置和分子間的對齊都是有可能影響的原因。圖 3-12(b.)是針對 overlap 和 gap 加總，分析交聯鍵在 overlap 和 gap 中的影響，可以看到在 1atm 下，deH44 在 overlap 擁有較多的氨基酸殘基，而 deH22 和 AGEs 則是在 gap 較多。

接下來我們依照圖 3-12 的結果畫出纖維圖，如圖 3-13、圖 3-14 所示。

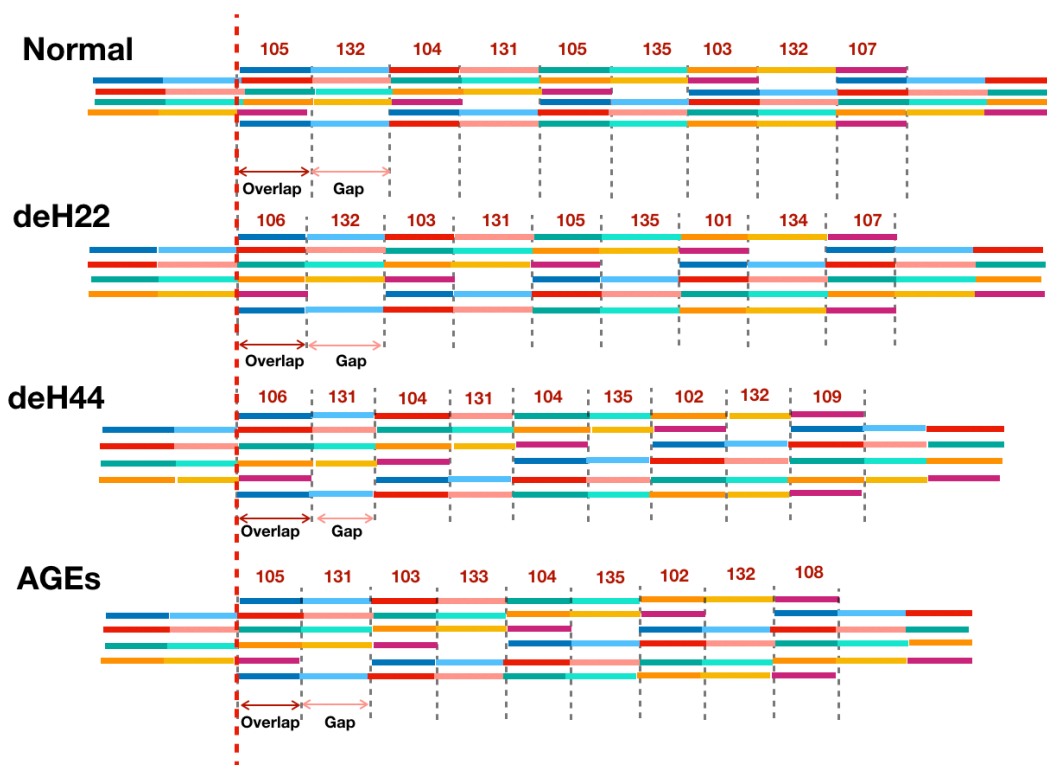


圖 3-13 在 1atm 下，各模型依照 overlap 和 gap 長度區分的纖維圖。

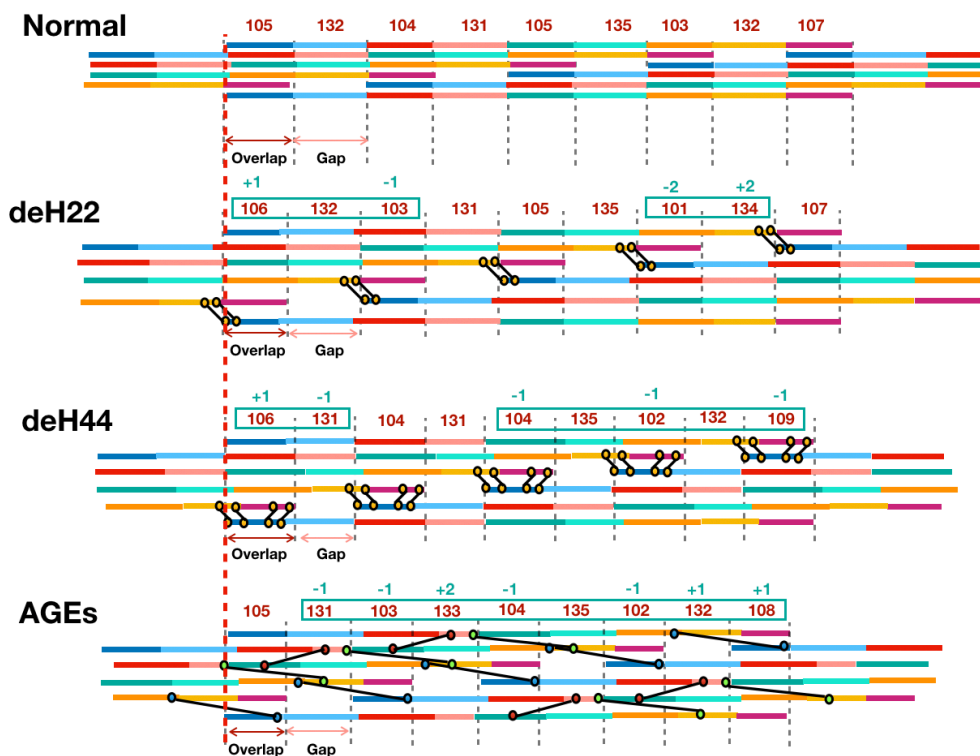


圖 3-14 在 1atm 下，對照 Normal 模型氨基酸殘基分佈的纖維圖。

圖 3-13、圖 3-14 結合了先前的頭尾端距、unit cell 的長度和 overlap 和 gap 的長度來繪製，其中圖 3-14 配合氨基酸殘基來繪製。

在 1atm 平衡下，以 Normal 模型作為基準對有交聯鍵的模型做比較，以 deH22 來說在平衡後，交聯鍵所接的位置 gap4 和 overlap1 會被稍微拉伸，造成較多的氨基酸殘基集中，deH44 在平衡下，交聯所在的位置也會被拉伸，並且因為交聯密集的把 overlap1 和 overlap5 固定住，所以這兩段的氨基酸殘基較多，AGEs 交聯接的位置較為複雜，不過有接交聯鍵的地方氨基酸殘基都是增加的，而相鄰的地方都會減少。再來我們分析在 60MPa 下 overlap/gap ratio，如圖 3-15 所示。

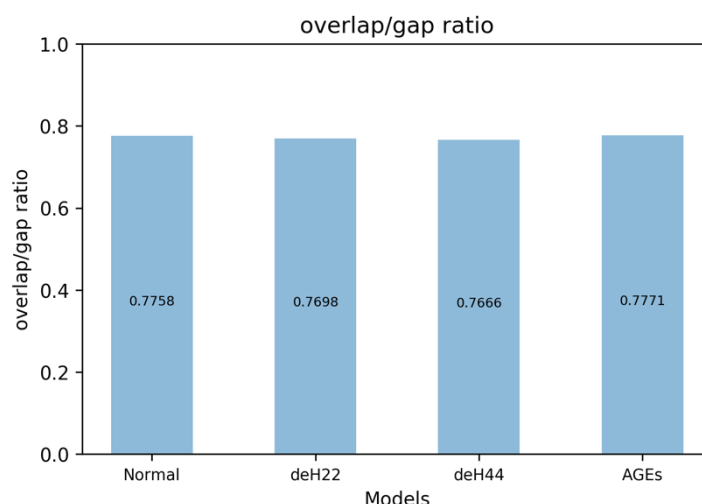


圖 3-15 在 60MPa 下，各個模型的 overlap/gap ratio。

由結果發現在受外力後 overlap/gap ratio 都下降了，原因可能是 overlap 伸長度比 gap 來得小，結果來看 AGEs 的 0.7771 最大，其次為 Normal 的 0.7758，再來是 deH22 的 0.7698，最後 deH44 的 0.7666 最小，由結果顯示雖然 overlap/gap ratio 都變小，但是 Normal 和 AGEs 是差不多的，而 deH22 和 deH44 下降較多。

接下來分別分析在 60MPa 下 overlap 和 gap 的長度，如圖 3-16 所示。

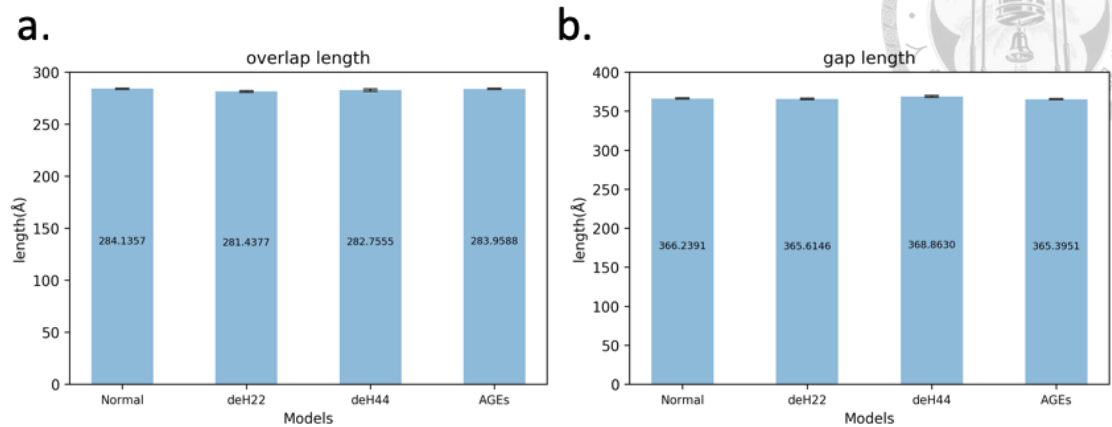


圖 3-16 在 60MPa 下，(a.)overlap 平均長度及(b.)gap 的平均長度。

由結果發現在 overlap 長度中，Normal 的 284.13 為最長，其次是 AGEs 的 283.95，再來是 AGEs 的 282.75，最後是 deH22 的 281.43，而在 gap 的長度中，最長的是 deH44 的 368.86，其次是 Normal 的 366.23，最後 deH22 和 AGEs 是差不多的，deH22 為 365.61，AGEs 為 365.9。接下來以上述的 overlap 和 gap 長度來對膠原蛋白分子中 alpha1-1 鏈的氨基酸殘基在 60MPa 下做區域的分類，如圖 3-17 所示。

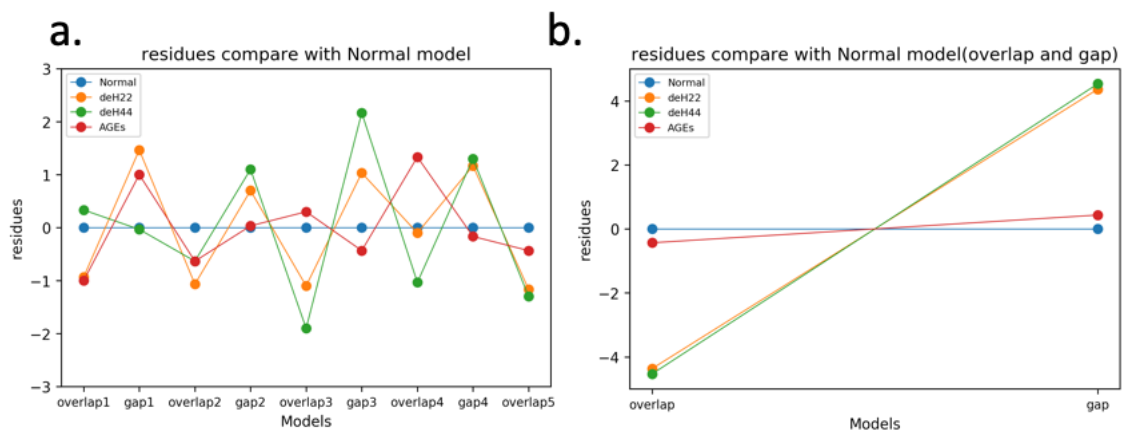


圖 3-17 在 60MPa 下，(a.)各區段氨基酸殘基的差值，(b.)overlap 和 gap 氨基酸殘基的差距。

由結果可以看到交聯鍵會影響膠原蛋白分子的氨基酸殘基的分佈，圖 3-17(a.) 分佈顯示，雖然 overlap 和 gap 的長度在單一模型中是固定的，但是所分佈氨基酸殘基的數目是不同的，也可以說每段的結構也不同，再來是不同交聯鍵的狀況下分佈也不同，交聯鍵的位置和分子間的對齊都是有可能影響的原因。圖 3-17(b.)是針對 overlap 和 gap 加總，分析交聯鍵在 overlap 和 gap 中的影響，可以看到在 60MPa 下，deH22 和 deH44 在 gap 擁有較多的氨基酸殘基，而 AGEs 也有相同趨勢但是較不明顯。接下來我們依照圖 3-17 的結果畫出纖維圖，如圖 3-18、圖 3-19 所示。

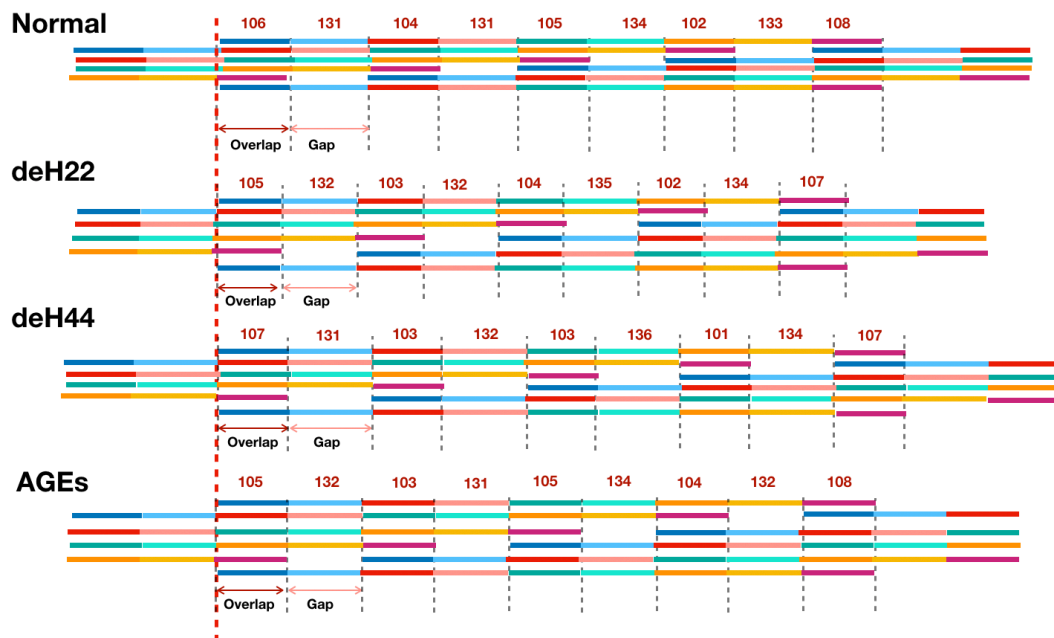


圖 3-18 在 60MPa 下，各模型依照 overlap 和 gap 長度區分的纖維圖。

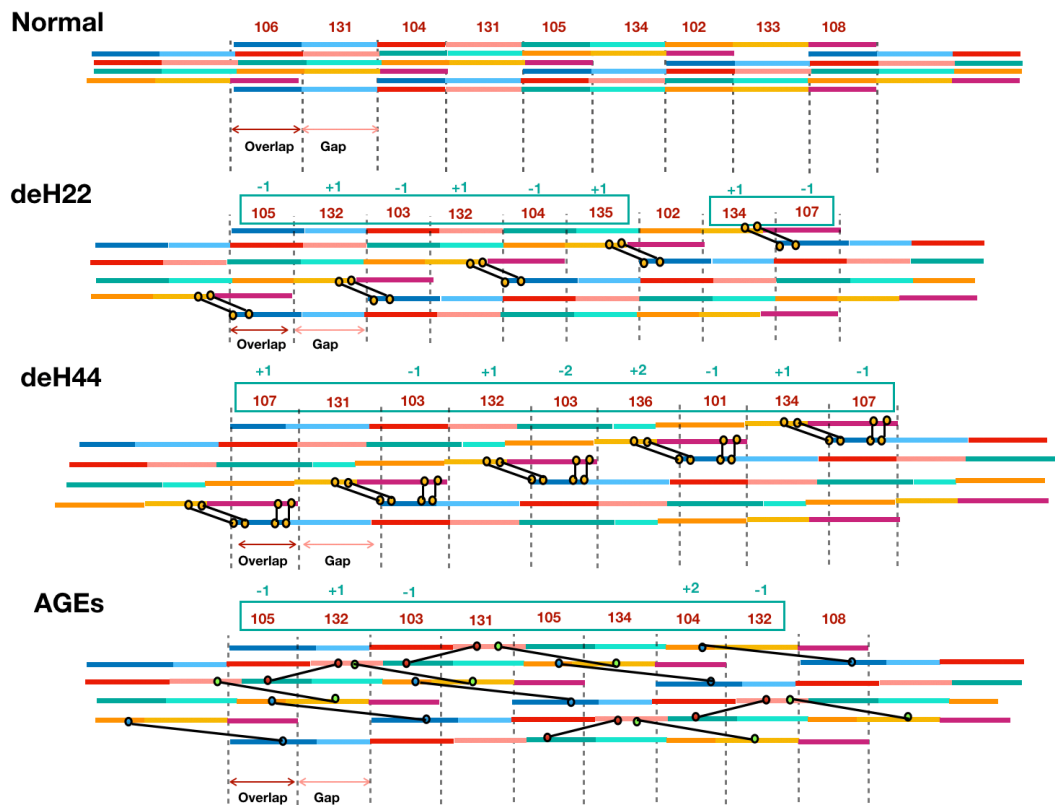


圖 3-19 在 60MPa 下，對照 Normal 模型氨基酸殘基分佈的纖維圖。

圖 3-18、圖 3-19 結合了先前的頭尾端距、unit cell 的長度和 overlap 和 gap 的長度來繪製，其中圖 3-19 配合氨基酸殘基來繪製，在 60MPa 平衡下，我們以 Normal 模型作為基準，對有交聯鍵的模型做比較，發現在拉伸後，大部分的分佈都會改變，deH22 在交聯鍵接點部分受拉，overlap 的氨基酸殘基都是減少的，而 deH44 在交聯鍵連接處是固定的變化不像 deH22 那樣的規則，不過大部分 overlap 都是減少的，只有在 overlap1 增加，AGEs 交聯鍵接的位置複雜，不過在拉伸下，overlap 和 gap 的氨基酸殘基分佈其實是差不多的，讓 overlap 和 gap 維持相同質量。

接下來比較相同模型在 1atm 下和 60MPa 下的氨基酸殘基分佈，首先分析 Normal 模型在 1atm 下和 60MPa 下的比較，如圖 3-20 所示。

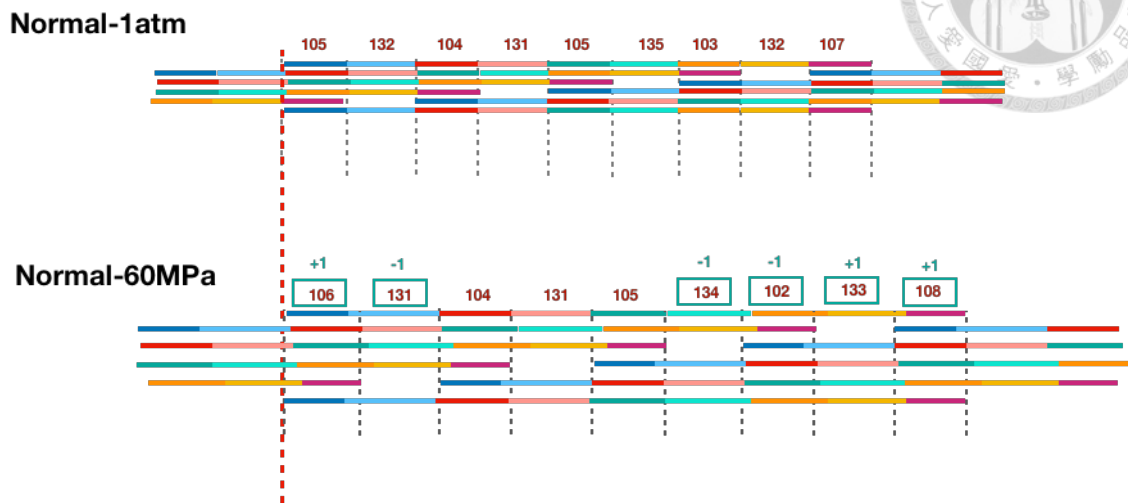


圖 3-20 Normal 模型在不同應力下的氨基酸殘基分佈纖維圖。

Normal 模型沒有交聯鍵，由結果顯示在拉伸時有分子間滑動現象，但是主要發生在分子兩端，可能受拉讓 N、C 兩端受到擠壓，所以氨基酸殘基數量較多。接下來分析 deH22 模型在 1atm 下和 60MPa 下的比較，如圖 3-21 所示。

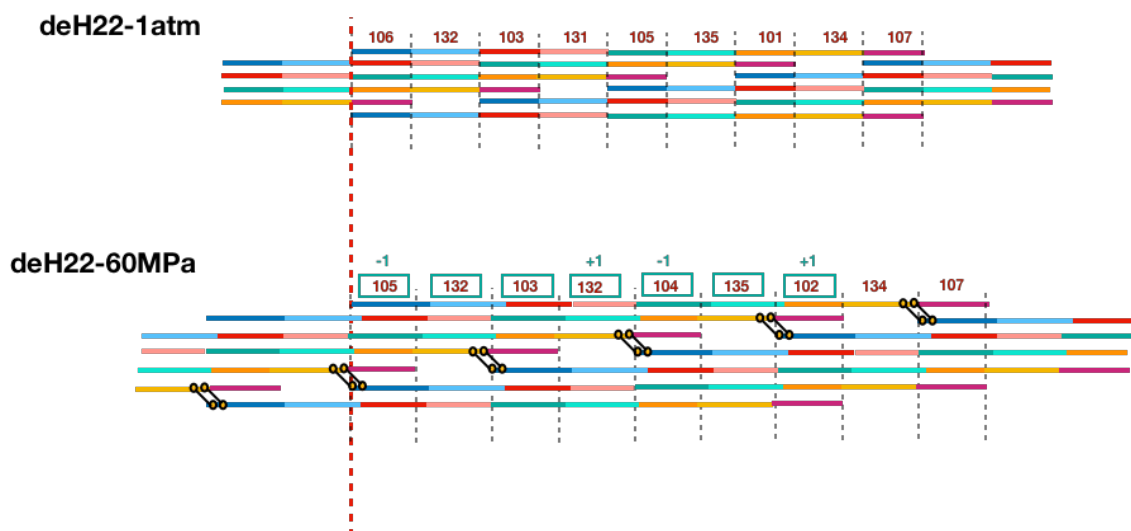


圖 3-21 deH22 模型在不同應力下的氨基酸殘基分佈纖維圖。

deH22 在 overlap1 和 gap4 的地方有交聯鍵，由解果顯示 N 端受到外力後表現比 C 端來的敏感，並且 overlap 在拉伸下氨基酸殘基減少，而 gap 增加。

接下來分析 deH44 模型在 1atm 下和 60MPa 下的比較，如圖 3-22 所示。

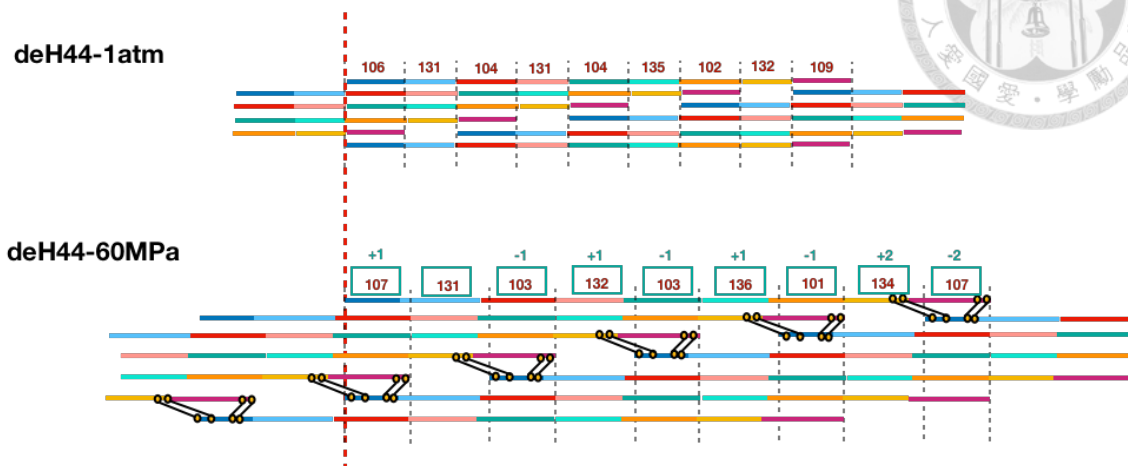


圖 3-22 deH44 模型在不同應力下的氨基酸殘基分佈纖維圖。

deH44 的交聯鍵在 gap4、overlap5 和 overlap1 上，因為交聯鍵密度較高，外力傳遞的效率較好也讓氨基酸殘基在受力之後重新分配，由結果顯示除了在 overlap1 以外，其餘的 overlap 和 gap 和 deH22 有類似的趨勢，overlap1 相反的趨勢可能來自左右交聯鍵束縛住，讓中間區域受壓。

接下來分析 AGEs 模型在 1atm 下和 60MPa 下的比較，如圖 3-23 所示。

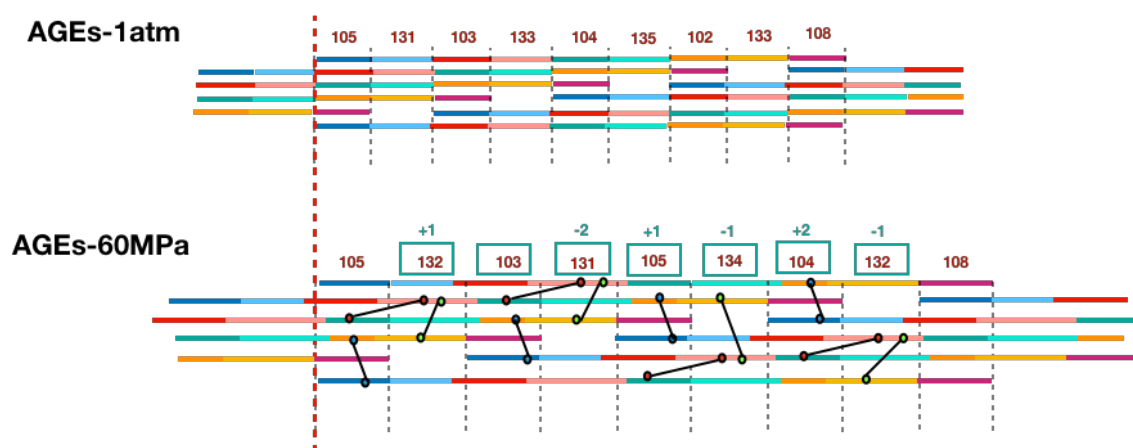


圖 3-23 AGEs 模型在不同應力下的氨基酸殘基分佈纖維圖。

AGEs 的交聯鍵遍佈在分子內，由結果顯示在 N、C 兩端的 overlap1 和 overlap5 影響較小，在受力之後氨基酸殘基在 overlap 增加，gap 減少。



3.2 分子尺度

本研究分析膠原蛋白分子的 unit height 和 radius 的分佈以及分佈的位置，讓我們了解交聯鍵對於分子尺度的影響。

3.2.1 分子的 unit height 分析

首先分析在 1atm 下，樣本時間 35ns-40ns 每階段 unit height 的變化，並作 unit height 的分佈，如圖 3-24 所示。

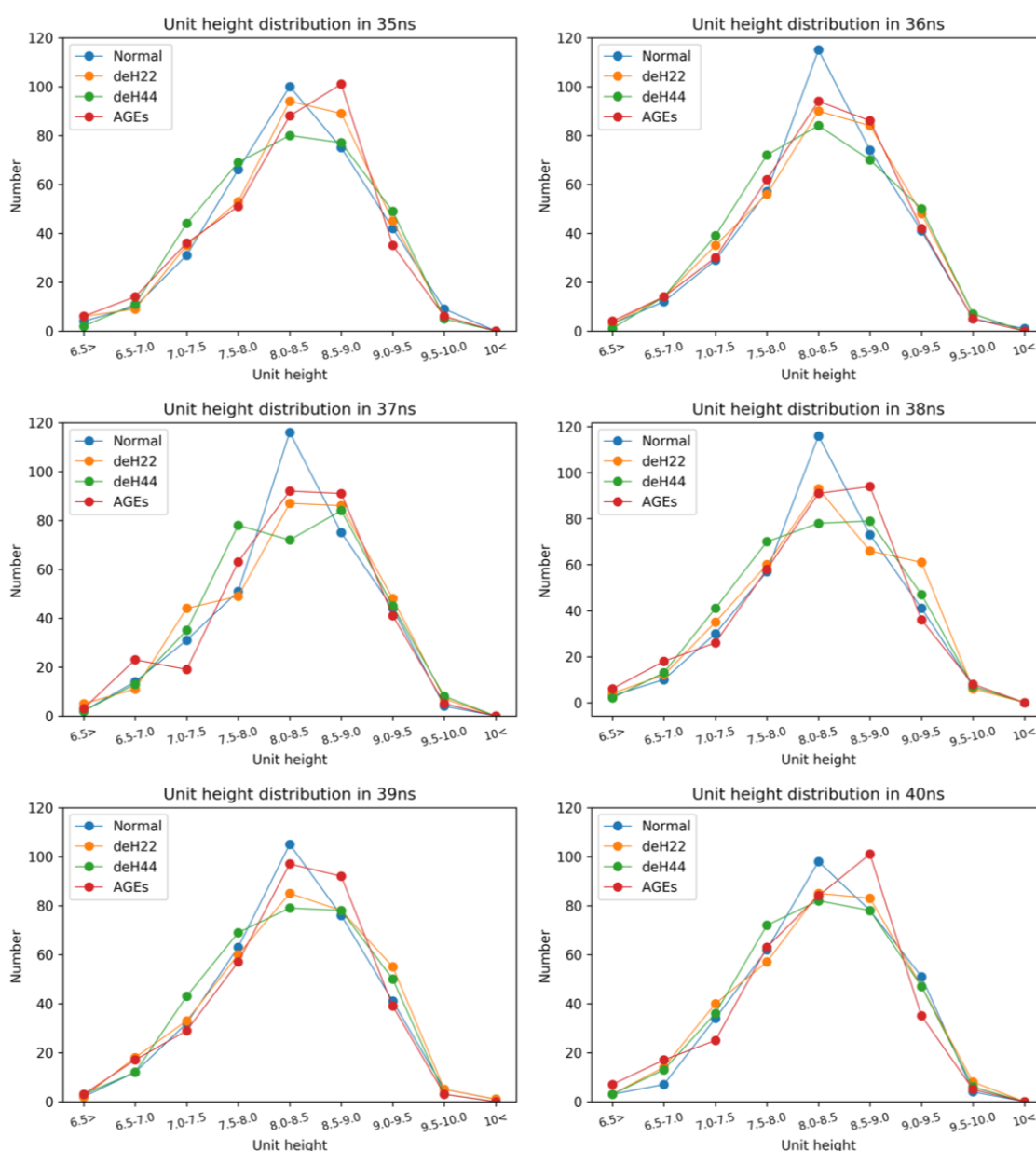


圖 3-24 在 1atm 下，樣本時間內 35ns-40ns 的 unit height 的分佈。

在平衡的過程中，分子是處於震動的狀態，每個模型的分佈也不盡相同，

Normal 模型在這些時間有較多的 unit height 在 8.0~8.5 之間，deH22 和 deH44 大部分時間會在 8.0~9.0 之間，而 AGEs 在 8.5~9.0 之間有峰值。接著在樣本時間內的所有 unit height 做平均後的分佈，如圖 3-25 所示。

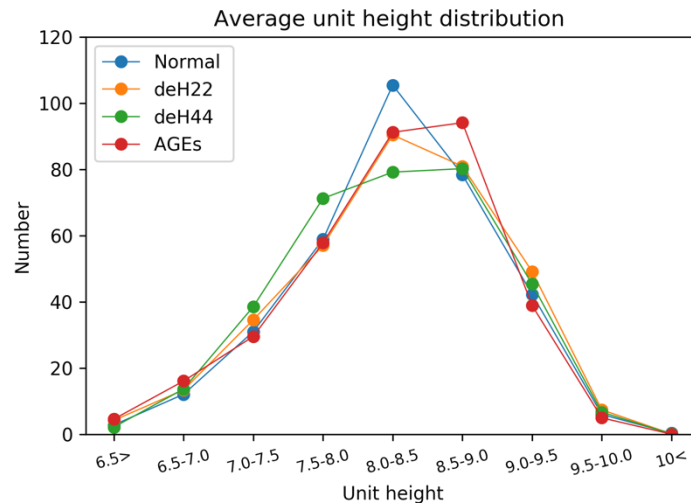


圖 3-25 在 1atm 下，樣本時間內分子所有 unit height 的平均分佈。

由結果發現平均後有保留下一些特徵，Normal 大部分在 8.0~8.5 之間，deH22 大部分在 8.0~8.5 之間，並在 9.0~9.5 之間有較多的分佈，deH44 較為分散，從 7.5~9.0 分佈較為平均，而 AGEs 分佈主要在 8.0~9.0 之間。

再來分析在 60MPa 下，分析樣本時間 7ns-10ns 每階段 unit height 的變化，並作 unit height 的分佈，如圖 3-26 所示。

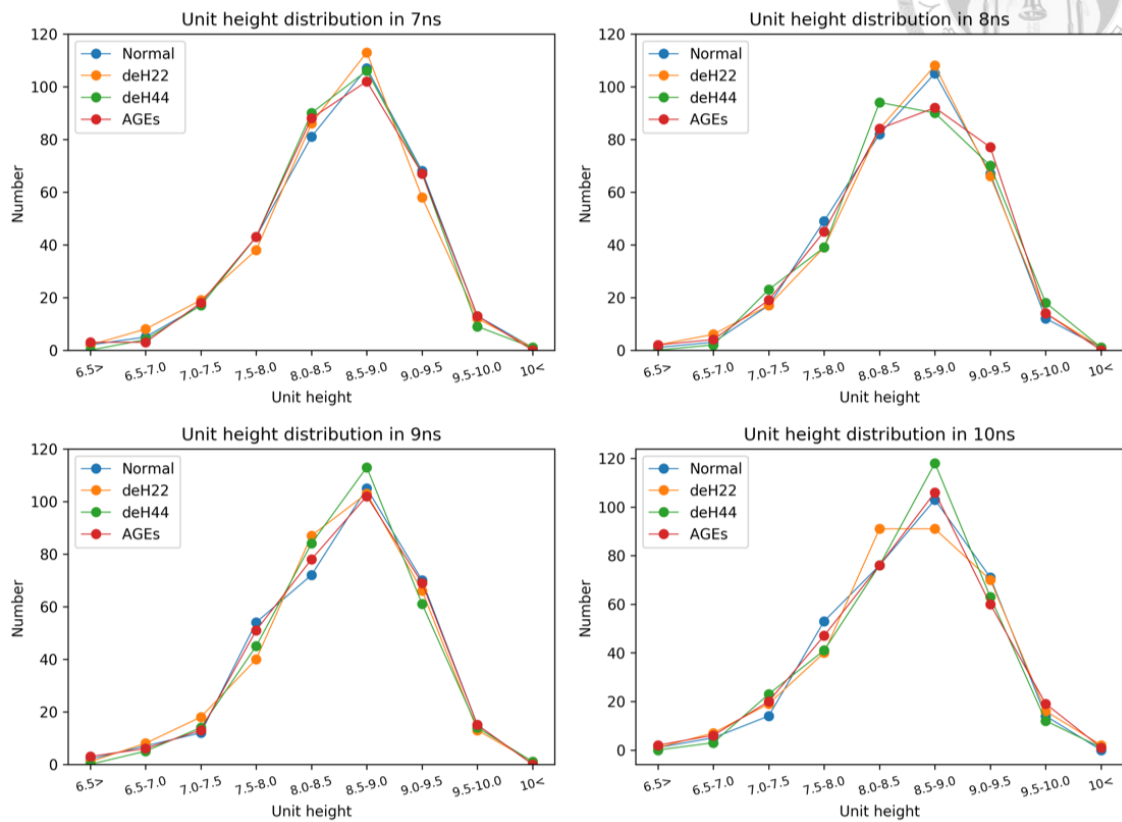


圖 3-26 在 60MPa 下，樣本時間內 7ns-10ns 的 unit height 的分佈。

在 60MPa 平衡的過程中，每個模型的分佈也不盡相同，Normal 模型在這些時間有較多的 unit height 穩定在 8.5~9.0 之間，deH22，deH44 的分佈會在 8.0~8.5 跟 8.5~9.0 之間跳動，AGEs 則在 8.5~9.0 和 9.0~9.5 之間跳動。

接著在樣本時間內的所有 unit height 平均後做分佈，如圖 3-27 所示。

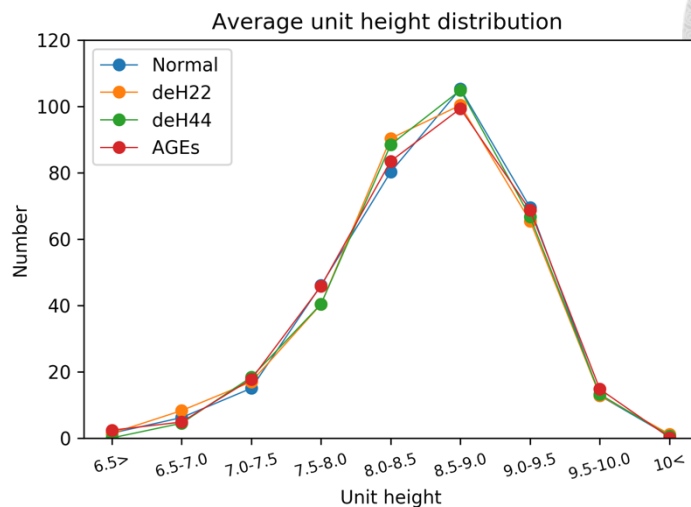


圖 3-27 在 60MPa 下，樣本時間內分子所有 unit height 的平均分佈。

由結果發現平均後，有保留下一些特徵的，Normal 大部分在 8.5~9.0 之間，deH22 大部分在 8.5~9.0 之間，並在 8.0~8.5 之間有較多的分佈，deH44 集中在 8.0~9.0 之間，而 AGEs 分佈主要在 8.5~9.0 之間。

3.2.2 分子的 radius 分析

首先分析 1atm 下的模型，樣本時間 35ns-40ns 每階段 radius 的變化，並作 radius 的分佈如圖 3-28 所示。

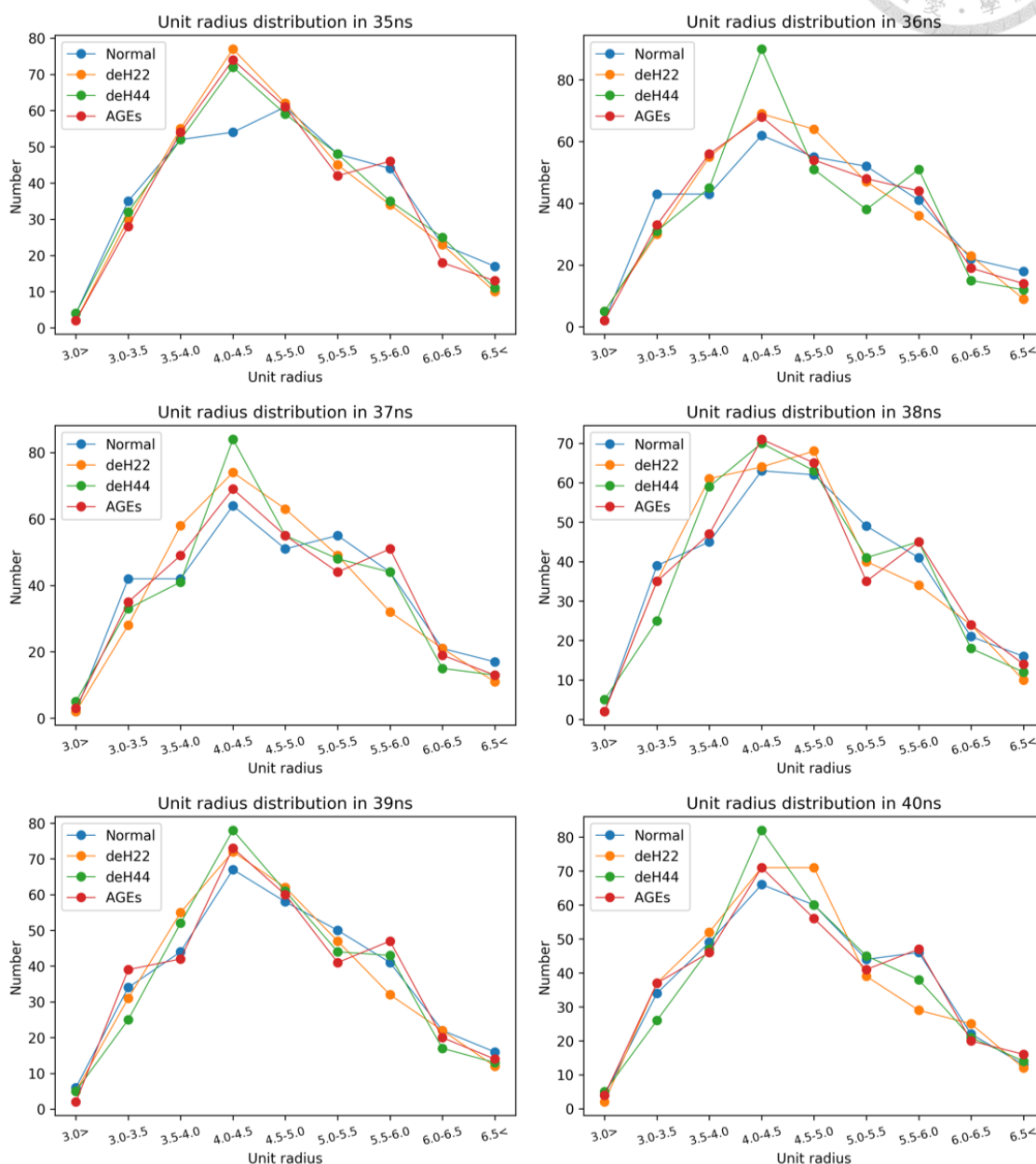


圖 3-28 在 1atm 下，樣本時間內 35ns-40ns 的 radius 的分佈。

在 1atm 平衡的狀態下，主要 radius 的分佈在 4.0~4.5 之間，Normal 的模型在 4.0~4.5 之間是最少的，這部分少的分佈在 5.5~6.0、6.5< 之間，deH22 主要分佈在 3.5~5.0 之間跳動，deH44 主要分佈 4.0~4.5 之間數量是四個模型最多的，並且在有些時間在 5.5~6.0 之間會有一個峰值，AGEs 主要分佈在 4.0~4.5 之間，但在 5.5~6.0 之間也會有個峰值。

接著我們把在 1atm 下時間內的所有 radius 做平均後的分佈，如圖 3-29 所示。

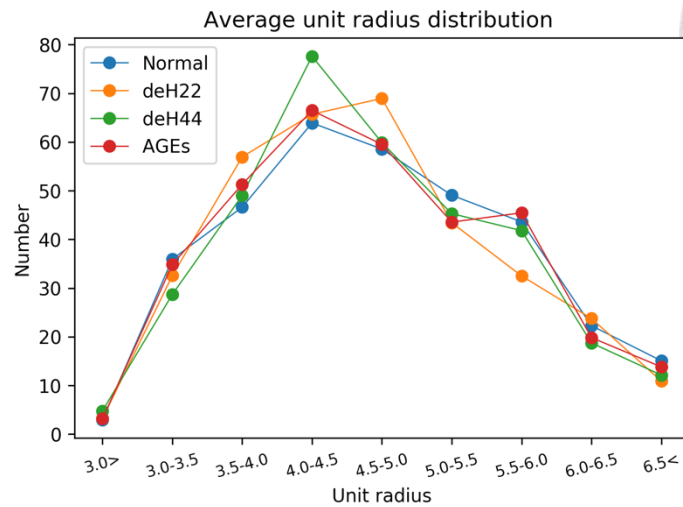


圖 3-29 在 1atm 下，樣本時間內分子所有 radius 平均的分佈。

平均之後，由結果觀察到 deH22 最多集中分佈在 4.0~4.5 之間，而 deH44 則是在 4.5~5.0 之間，Normal 和 AGEs 雖然主要分佈在 4.0~4.5 之間，但是在 5.0~6.0 之間分佈得數量比 deH22 和 deH44 來得多。再來在 60MPa 下，分析在樣本時間 7ns-10ns 每階段 radius 的變化，如圖 3-30 所示。

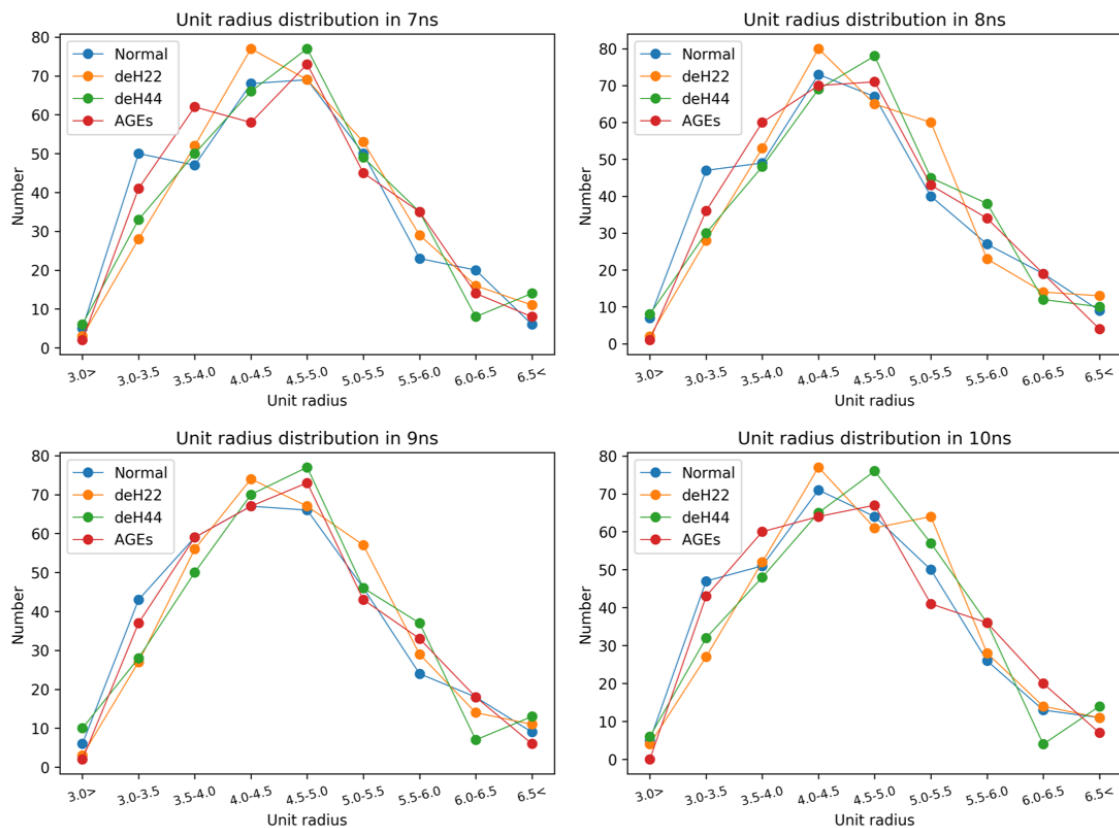


圖 3-30 在 60MPa 下，樣本時間內 7ns-10ns 的 radius 的分佈。

在 60MPa 受力下，主要 radius 分佈也開始發生變化，Normal 主要分佈還是在 4.0~4.5 之間，但是原本在 1atm 下 5.5~6.0 的部分減少了，反而是 3.0~3.5 之間增加了，deH22 主要分佈在 4.0~5.5 之間跳動，deH44 主要分佈在 4.5~5.0 之間，AGEs 主要分佈在 4.5~5.0 之間。

接著我們把在 60MPa 下在時間內的所有 radius 做平均後的分佈，如圖 3-31 所示。

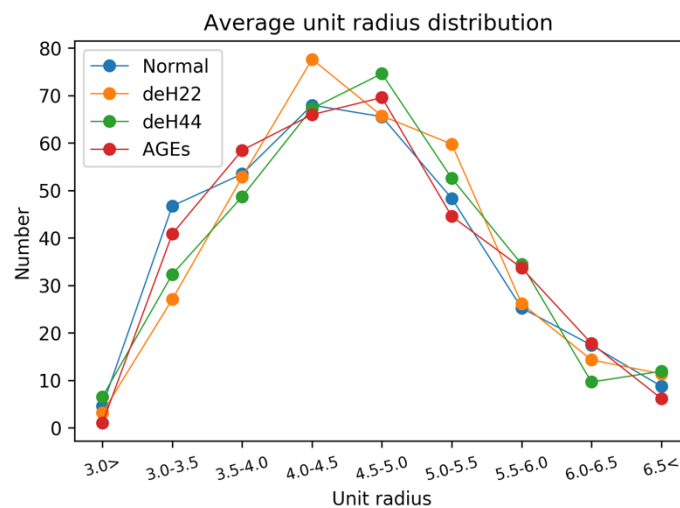


圖 3-31 在 60MPa 下，樣本時間內分子所有 radius 平均的分佈。

平均之後，由結果可以看到 deH22 在 4.0~4.5 之間分佈最多，在 5.0~5.5 之間也是最多的，deH44 在 4.5~5.0 之間分佈最多，Normal 主要分佈在 4.0~4.5 之間，但在 3.0~3.5 之間分佈比其他模型來的多，AGEs 主要分佈在 4.5~5.0 之間，在 3.5~4.0 有較多的趨勢。

3.3 結果與討論

方均根位移代表著分子模型的穩定性，平均位移越多代表平衡所需要的位移較多，而我們定義標準差在 1 Å 以內算穩定狀態，我們選取的樣本時間內的標準差都在 1 Å 以內，都屬於穩定平衡狀態，在其中我們發現，標準差越大，模型越不穩定，反之標準差越小，模型越穩定。在 1atm 下，方均根位移大小為：Normal > deH44 > AGEs > deH22，而在 60MPa 下，方均根位移大小為：AGEs > deH22 > deH44 > Normal，在受力之後，AGEs 和 deH22 的穩定性會變差，而 Normal 和 deH44 會由不穩定變穩定。

分析 unit cell 的長度變化，在 1atm 下 unit cell 長度大小為：Normal > deH22 > deH44 > AGEs，而 60MPa 下 unit cell 的長度大小為：deH44 > Normal > AGEs > deH22，unit cell 長度重要的地方在於 overlap 和 gap 的分配及大小需要知道 D-period 的長度才能計算。

分析頭尾端距，在我們選定的樣本時間內，1atm 平衡長度大小為：Normal > deH22 > deH44 > AGEs，而 60MPa 下平衡長度大小為：deH44 > Normal > AGEs > deH22，再來我們分析分子伸長量與應變大小為：deH44 > AGEs > Normal > deH22，由此可以知道在 1atm 下分子長度會受到交聯鍵的影響，讓分子與分子對齊，所以有交聯鍵的分子都比較短，而受到外力的情況下，各個模型的伸長量會因為交聯鍵質量密度和位置而有所差別，雖然在 60MPa 下 Normal 模型比 AGEs 稍微長一點，但其實伸長量是 AGEs 較高的，所以我們推論因為有交聯鍵的存在外力傳遞給分子的效率也較好，所以拉長較多，也許我們用 120MPa 甚至 180MPa 可以看到有交聯鍵的纖維長度會比 Normal 來得長。

在 overlap 和 gap 的分析上，首先先看 overlap/gap ratio，在 1atm 下四個模型的 ratio 是差不多的，而在 60MPa 下四個模型都下降，但是 deH22 和 deH44 下降較為明顯，下降的原因是 overlap 伸長量比 gap 伸長量較少。接下來看 overlap 和 gap 在平衡下的長度，在 1atm 下 overlap 的長度是：Normal > deH44 > deH22 > AGEs，gap 長度大小為：Normal > deH22 > AGEs > deH44，在 60MPa 下，overlap 長度大小為：Normal > AGEs > deH44 > deH22，gap 長度大小為：deH44 > Normal

> deH22 > AGEs，我們進一步分析 overlap 和 gap 的伸長量如圖 3-32 所示，

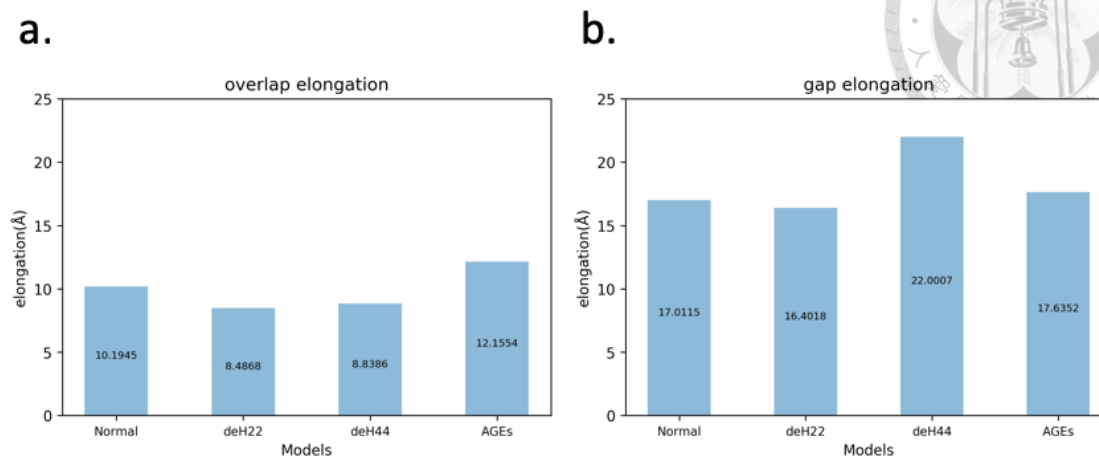


圖 3-32 從 1atm 到 60MPa，(a.)overlap 的伸長量，(b.)gap 的伸長量。

以 overlap/gap ratio 來說，deH22 和 deH44 的 ratio 下降較多，主要的原因不同，deH22 是因為 deH22 的伸長量較少，而 deH44 是 gap 伸長量較多。以膠原蛋白纖維圖來看，在 1atm 下，有交聯鍵的地方在平衡的時候會被拉伸，以 deH22 來說在平衡後，交聯鍵所接的位置 gap4 和 overlap1 會被稍微拉伸，造成較多的氨基酸殘基集中，deH44 在平衡下，交聯鍵所在的位置也會被拉伸，並且因為交聯鍵密集的把 overlap1 和 overlap5 固定住，所以這兩段的氨基酸殘基較多，AGEs 交聯鍵接的位置較為複雜，不過有接交聯鍵的地方氨基酸殘基都是增加的，而相鄰的地方都會減少，而在 60MPa 下，大部分的分佈都會改變，在 deH22 在交聯鍵接點部分受拉，overlap 的氨基酸殘基都是減少的，而 deH44 在交聯鍵連接處是固定的不像 deH22 那樣的規則，不過大部分 overlap 都是減少的，只有在 overlap1 增加，AGEs 交聯鍵接的位置複雜，不過在拉伸下，overlap 和 gap 的氨基酸殘基分佈其實是差不多的，讓 overlap 和 gap 維持相同質量。

接下來分子尺度主要分析分子的 unit height 和 radius 的分佈狀況，在 1atm 下，Normal 的 unit height 主要分佈在 8.0~8.5 之間，而 deH22 和 AGEs 分佈在 8.0~9.0 之間，deH44 則主要分佈在 7.5~9.0 之間，而在 60MPa 下，各個模型分佈也較相似，Normal 大部分在 8.5~9.0 之間，deH22 大部分在 8.5~9.0 之間，並在 8.0~8.5 之間有較多的分佈，deH44 集中在 8.0~9.0 之間，而 AGEs 分佈主要在 8.5~9.0 之間。

再來 radius 的分析，在 1atm 下，由結果觀察到 deH22 最多集中分佈在 4.0~4.5

之間，而 deH44 則是在 4.5~5.0 之間，Normal 和 AGEs 雖然主要分佈在 4.0~4.5 之間，但是在 5.0~6.0 之間分佈得數量比 deH22 和 deH44 來得多，而在 60MPa 下，由結果可以看到 deH22 在 4.0~4.5 之間分佈最多，在 5.0~5.5 之間也是最多的，deH44 在 4.5~5.0 之間分佈最多，Normal 主要分佈在 4.0~4.5 之間，但在 3.0~3.5 之間分佈比其他模型來的多，AGEs 主要分佈在 4.5~5.0 之間，在 3.5~4.0 有較多的趨勢。

第4章、交聯鍵對膠原蛋白的降解區域的影響

本研究分析的降解區域主要取 resid⁷⁶⁹-resid⁷⁸³ 作為我們分析的區域[95]，分析他們的頭尾端距、unit height、radius 和區域氫鍵，來看結構的變化，來怎麼影響 MMP1 的作用。先前的研究指出酵素作用在膠原蛋白上會有幾個階段[76]，如下：

1. 作用酵素找到切割位置。
2. 結構是否有展開或解旋。
3. 酵素和蛋白質形成穩定的氫鍵。
4. 酵素解旋，並切斷氨基酸鏈的共價鍵。

其中本研究注重在第二點，因為膠原蛋白為三股螺旋結構，不同於其他蛋白質，酵素要接上去作用或切開都是比較困難的，除非三股螺旋結構鬆散，有單獨的氨基酸鏈露出，才會繼續往第三、四步作用，最後到降解。

本研究分析降解區域的頭尾端距可以知道應力為降解區域的影響是否敏感，分析降解區域的 unit height 可以看出酵素作用區域空間的分佈以及大小，分析 radius 可以看出酵素接上膠原蛋白的難易程度，而在 hydrogen bonds 可以觀察氨基酸鏈以及三股螺旋結構的變化，如圖 4-1 所示。

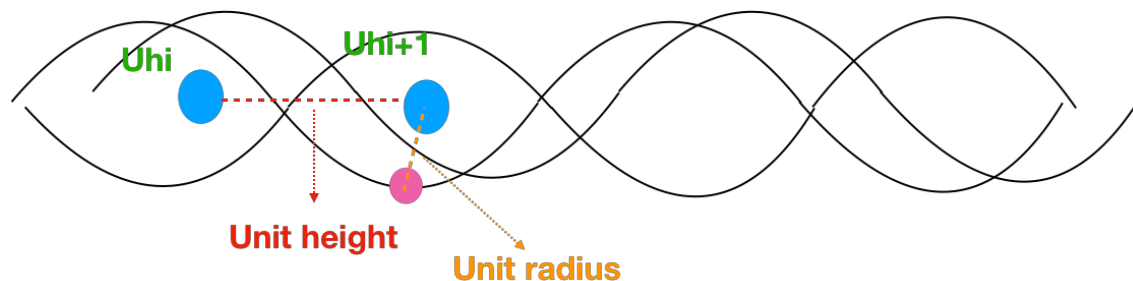


圖 4-1 unit height 和 radius 參考圖。



4.1 降解區域頭尾端距分析

降解區域的頭尾端距可以看成酵素作用的空間，要有一定的作用空間酵素接上去的機率也會比較高。

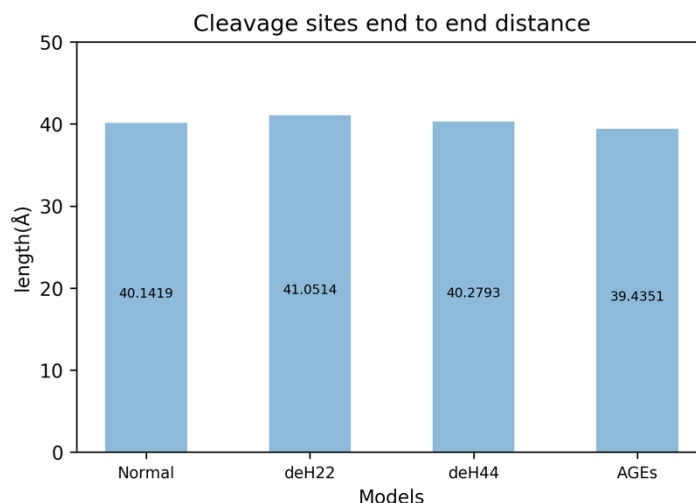


圖 4-2 在 1atm 下，降解區域的頭尾端距

首先分析 1atm 下降解區域的頭尾端距如圖 4-2 所示，由結果發現 deH22 為 41.05 最高，其次為 deH44 的 40.27，再來 Normal 的 40.14，最後是 AGEs 的 39.43，deH22 在降解區域有最大的空間來讓酵素作用，Normal 和 deH44 長度差不多，而 AGEs 空間為最小。

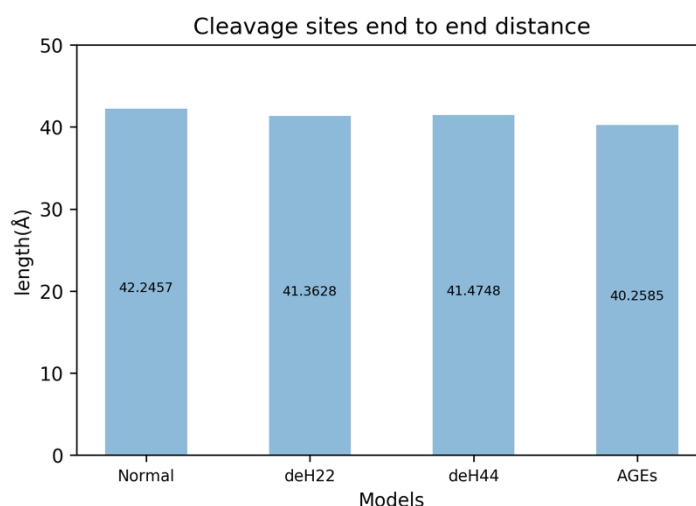


圖 4-3 在 60MPa 下，降解區域的頭尾端距

再來分析在 60MPa 下降解區域的頭尾端距如圖 4-3 所示，由過果發現 Normal 為 42.24 最高，其次為 deH44 的 41.47，再來是 deH22 的 41.36，最後是 AGEs 的 40.25，在受 60MPa 的情況下，Normal 的降解區域被拉伸為長度最長，再來 deH22 和 deH44 差不多，最後空間最短的還是 AGEs。

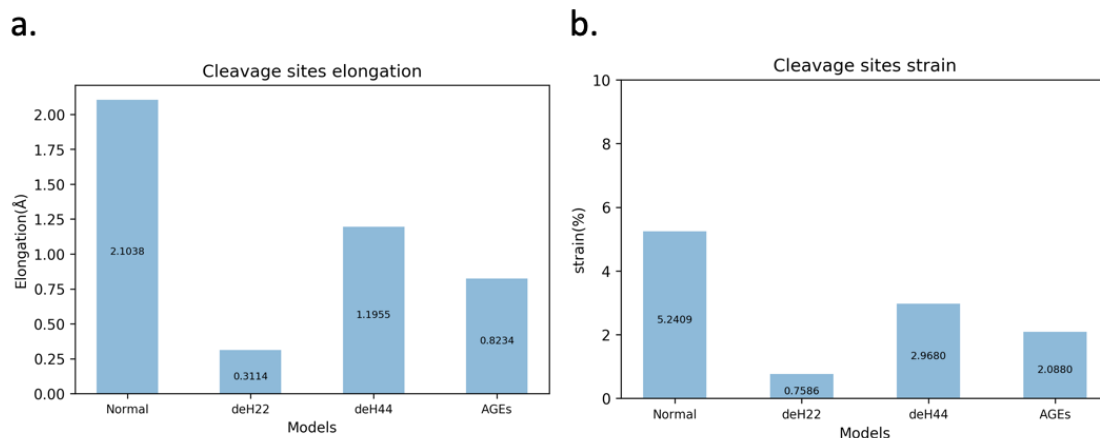


圖 4-4(a.)1atm 到 60MPa 的降解區域伸長量(b.) 1atm 到 60MPa 的降解區域應變

接下來分析在 1atm 到 60MPa 中伸長量以及應變如圖 4-4 所示，在 1atm 到 60MPa 中圖 4-4(a.)，發現伸長量 Normal 的 2.1038 最高，其次為 deH44 的 1.1955，再來 AGEs 的 0.8234，最後是 deH22 的 0.3114，對於降解區域來說，變化越大代表對於應力的敏感度越大，結果表示 Normal 在降解區域的敏感度大於其他三者，而 deH22 對於應力的敏感度為最低，再來看應變關係圖 4-4 (b.)，應變最大為 Normal 的 5.24 最高，其次為 deH44 的 2.96，再來 AGEs 的 2.08，最後是 deH22 的 0.75，以應變來看，Normal 是最大的，而 deH22 還是最小的。

當然有可能是因為分子整體的伸長量本身就低，影響到降解區域的伸長量，不過伸長量排序第三的 Normal 模型在降解區域的伸長量大於其餘三者，代表在沒有交聯鍵的情況下，膠原蛋白分子的降解區域對應力的敏感度很高，而有交聯鍵的膠原蛋白纖維敏感度較低。

4.2 降解區域 unit height 分析

降解區域的 unit height 分析是針對氨基酸殘基的位置做分析，可以看出較為細部的變化，通常 unit height 越大，所對應的空間也越大，相反的 unit height 越小，則空間越小。我們先分析 1atm 下，樣本時間 35ns-40ns 每階段的 unit height 變化，並作距離的分佈，如圖 4-5 所示。

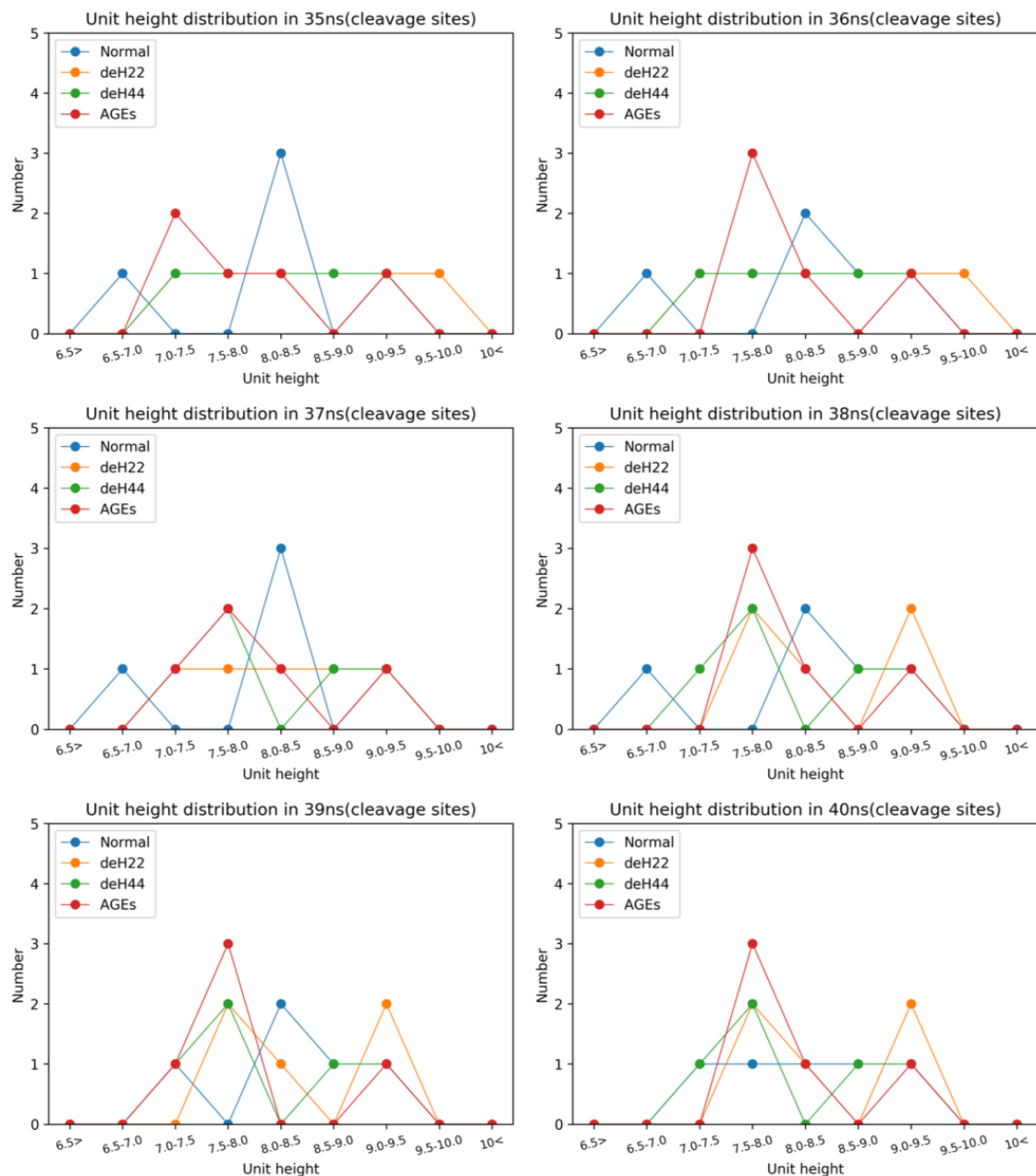


圖 4-5 在 1atm 下，降解區域 35ns-40ns 的 unit height 的分佈。

在平衡的過程中，分子是處於震動的狀態，每個模型的分佈也不盡相同，Normal 模型在這些時間有較多的 unit height 在 8.0~8.5 之間，deH22 有少許時間會在 9.0~9.5 之間有一峰值，而 deH22，deH44，AGEs 在 7.5~8.0 之間有峰值。

接著把降解區域在時間內的所有 unit height 做平均後在距離分佈，如圖 4-6 所示。

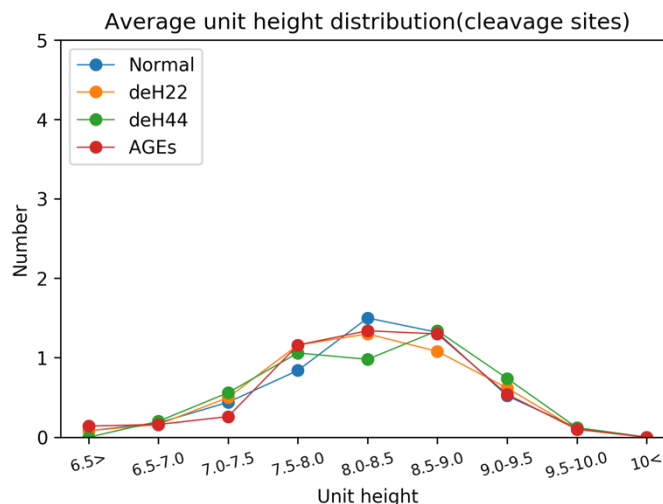


圖 4-6 在 1atm 下，樣本時間內降解區域所有距離的平均分佈。

由結果發現平均後各個模型的分佈不會像單獨一個時間點那麼明顯，可能是因為所有的時間內，震動以及位移的造成的消散，但是還是有保留下一些特徵的，像是在 7.5~8.0 的 deH22，deH44，AGEs 有最高的值，Normal 在 8.0~8.5 有最高的值，而 deH22 和 deH44 在 9.0~9.5 有最高的值，也符合上述的特徵。

在 1atm 下 unit height 主要分佈的區間在 6.5~10.0，7.0~7.5 較多的是 Normal、deH22、deH44 而 AGEs 最低，7.5~8.0 deH22、deH44、AGEs 較為相近而 Normal 為最低，8.0~8.5 是 Normal 較高，AGEs、deH22 較為相近而 deH44 為最低，9.0~9.5 deH44 較高而 Normal、deH22、AGEs 差不多。

接下來分析降解區域中的氨基酸序列 unit height 的分佈，如圖 4-7 所示。

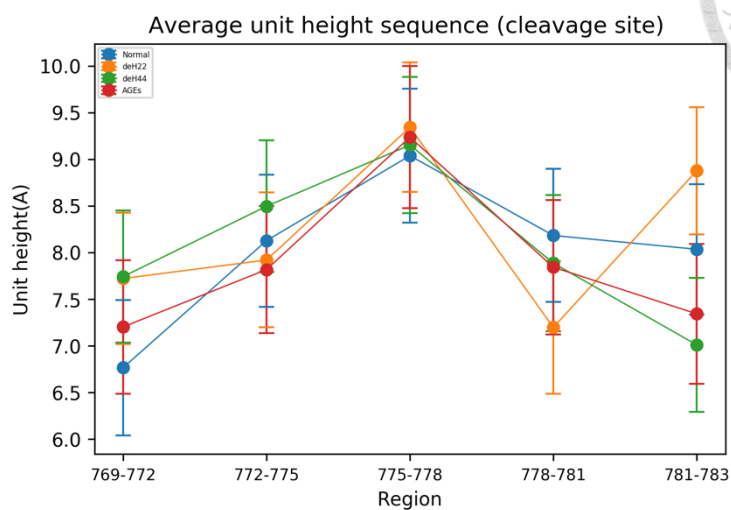


圖 4-7 在 1atm 下，降解區域的 unit height 分佈。

由結果發現標準差普遍較大，驗證說單一時間下的狀態不能代表樣本時間下的狀態，再來我們分析序列位置，主要切割位置在 $\text{resid}^{775}\sim\text{resid}^{778}$ ，由結果發現在這個位置與其他位置相比是較高的，其中大小為 deH22 最大，其次是 AGEs，再來是 deH44，最後 Normal 為最小，而 deH22 在 $\text{resid}^{781}\sim\text{resid}^{783}$ 和其他模型有不同的趨勢。

再來分析在 60MPa 下，分析 7ns-10ns 每階段 unit height 的變化，並作距離的分佈，如圖 4-8 所示。

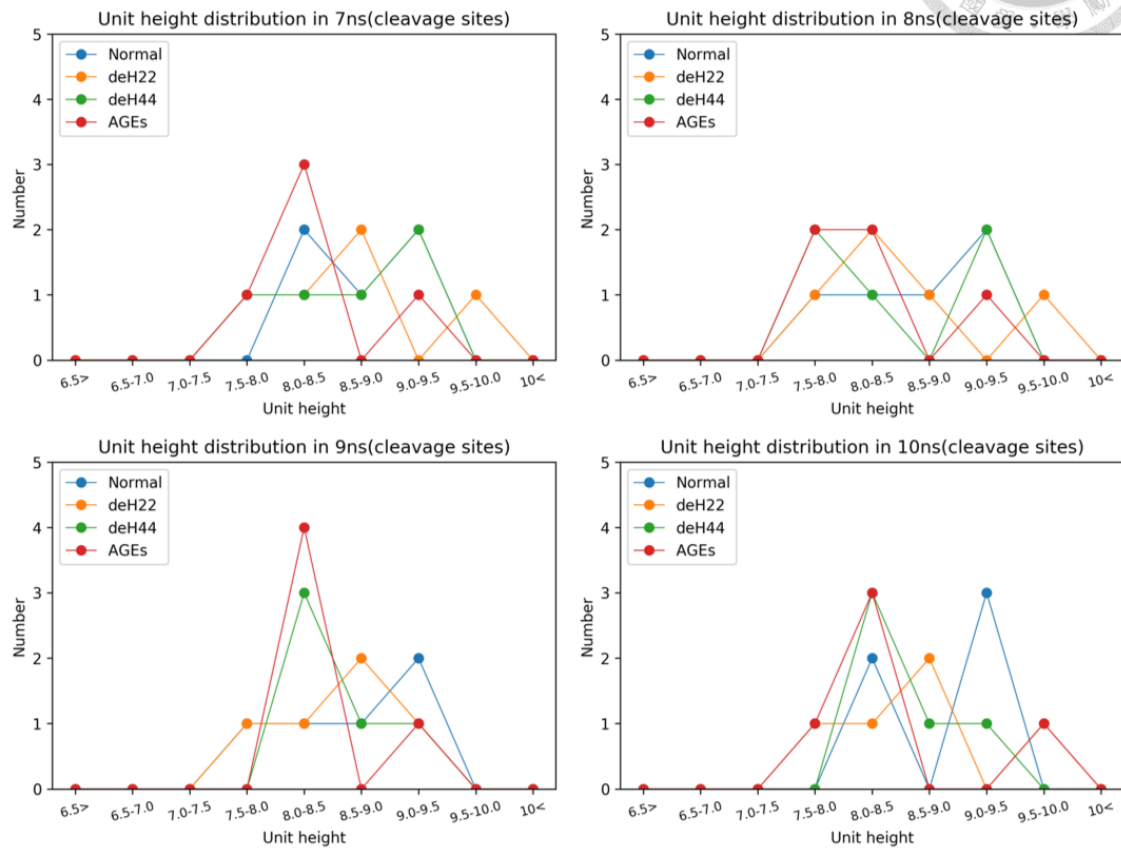


圖 4-8 在 60MPa 下，降解區域 7ns-10ns 的 unit height 的分佈。

由結果發現受 60MPa 應力下，大部分的分佈往右平移，說明在降解區域是有在拉伸的，並且分子是處於震動的狀態，每個模型的分佈也不盡相同，Normal 模型在 9.0~9.5 有一個峰值，deH22 在 8.5~9.0 有一個峰值，deH44 和 AGEs 在 8.0~8.5 有峰值。

接著把降解區域在時間內的所有 unit height 做平均後在分佈，如圖 4-9 所示。平均後，所有模型的分佈不會像單獨一個時間點那麼明顯，可能是因為所有的時間內，震動以及位移的造成的消弭。

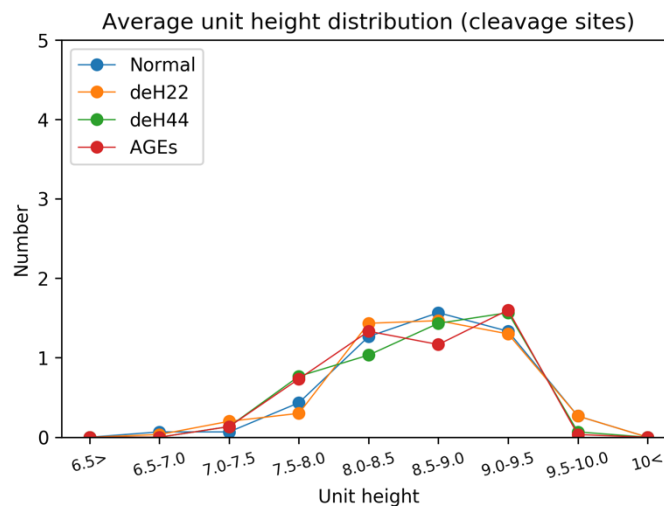


圖 4-9 在 60MPa 下，樣本時間內降解區域所有距離平均的距離分佈。

由結果可以看到在 60MPa 下 unit height 主要分佈的區間在 7.0~10.0，7.5~8.0 較多的是 Normal 和 AGEs，8.0~8.5 Normal、deH22、AGEs 較為相近而 deH44 為最低，8.5~9.5 則是 Normal、deH22、deH44 較為相近而 AGEs 為最低，9.0~9.5 AGEs 和 deH44 較高而 Normal 和 deH22 較低。

再來分析在降解區域的氨基酸序列中，unit height 的分佈，如圖 4-10 所示。

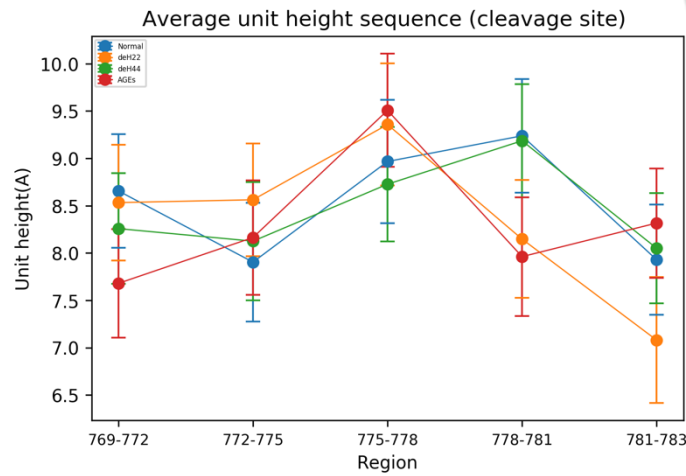


圖 4-10 在 60MPa 下，降解區域的 unit height 分佈。

由結果顯示 60MPa 和 1atm 的標準差較大，代表在 60MPa 下也是振動的狀態，但是在受力狀態下，有些模型最大的值不是在切割位置 $\text{resid}^{775}\sim\text{resid}^{778}$ 之間，像 Normal 和 deH44，最大區間變成 $\text{resid}^{778}\sim\text{resid}^{781}$ 間，而 deH22 和 AGEs 最大還是在 $\text{resid}^{775}\sim\text{resid}^{778}$ 間，說明不同的交聯鍵在受力後降解區域的 unit height 分佈也會改變。

綜合以上結果，不管在 1atm 或 60MPa 平衡下，都是處於一直震動的動態平衡，而在 1atm 下，不論交聯鍵的質量密度或交聯鍵的位置在 $\text{resid}^{775}\sim\text{resid}^{778}$ 有最大的距離，並且附近的趨勢也差不多，但在 60MPa 下，Normal 和 deH44，最大區間變成 $\text{resid}^{778}\sim\text{resid}^{781}$ 間，而 deH22 和 AGEs 最大還是在 $\text{resid}^{775}\sim\text{resid}^{778}$ 間。

如果 unit height 越大，代表酵素有較大的空間可以作用，使得膠原蛋白分子容易被切割，相反的越小越不容易被切割，從 1atm 到 60MPa 的變化可以知道，Normal 和 deH44 在降解區域有相似的表現，對應力較為敏感，並且最大的 unit height 從 $\text{resid}^{772}\sim\text{resid}^{775}$ 轉換到 $\text{resid}^{778}\sim\text{resid}^{781}$ ，代表降解能力隨著受力而改變，而 AGEs 和 deH22 對於應力的反應較小，沒什麼改變。

4.3 降解區域 radius 分析

降解區域的 radius 代表著三條氨基酸鏈的內部空間，如果越大代表三條氨基酸鏈離越遠，越小則越近，主要是用來觀察跟判斷在這區域內膠原蛋白分子有沒有解開(unfolding)。

首先觀察 1atm 下的模型，先分析樣本時間在 35ns-40ns 每階段的變化，如圖 4-11 所示。

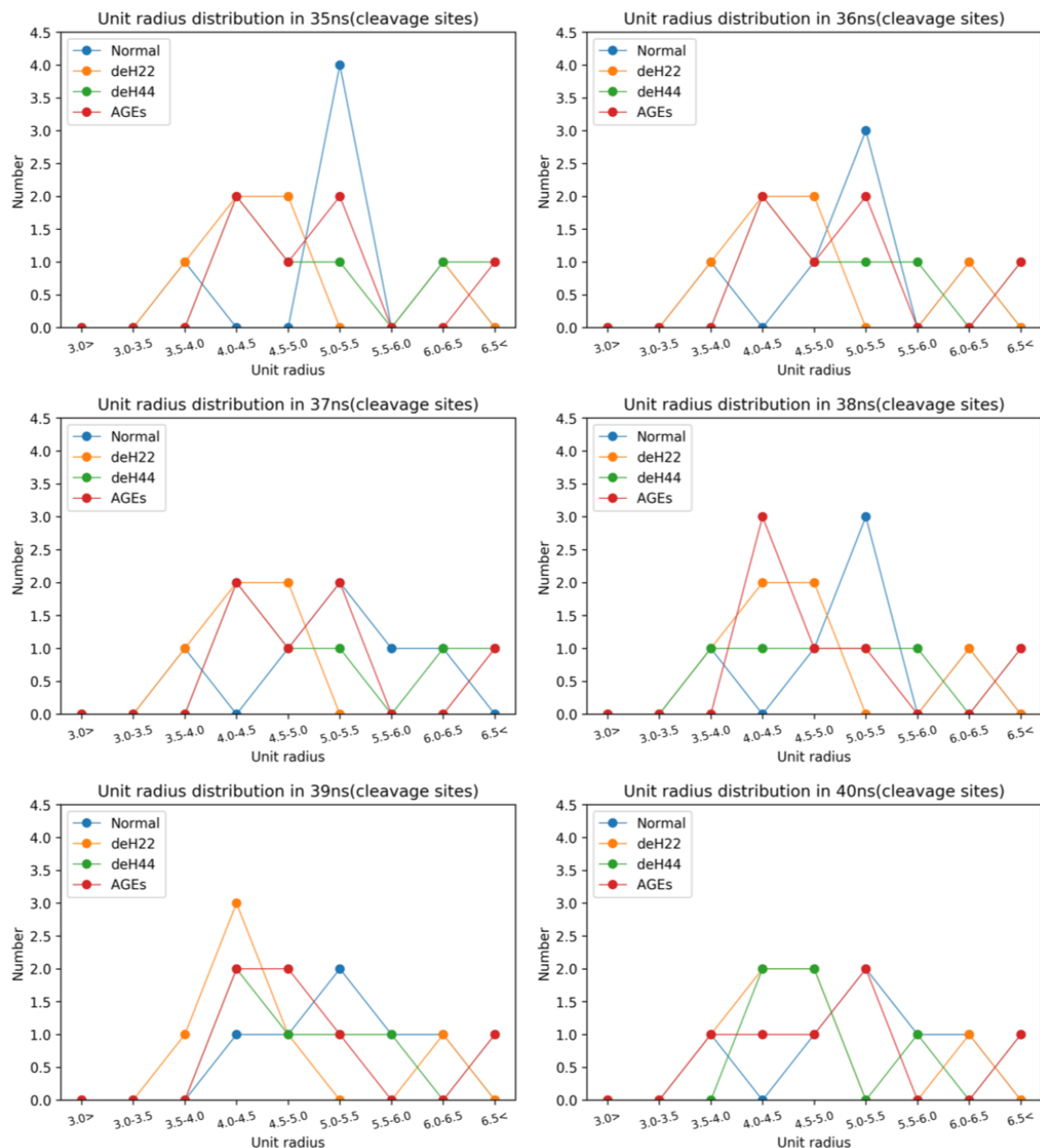


圖 4-11 在 1atm 下，講解區域 35ns-40ns 的 radius 分佈。

在平衡的過程中，分子是處於震動的狀態，每個模型的分佈也不盡相同，

Normal 模型在這些時間有較多的 unit height 在 5.0~5.5 之間，而 deH22，deH44 則集中在 3.5~5.5 之間，AGEs 在集中在 4.5~5.5。接著把降解區域在時間內的所有 radius 做平均後在分類，如圖 4-12 所示。

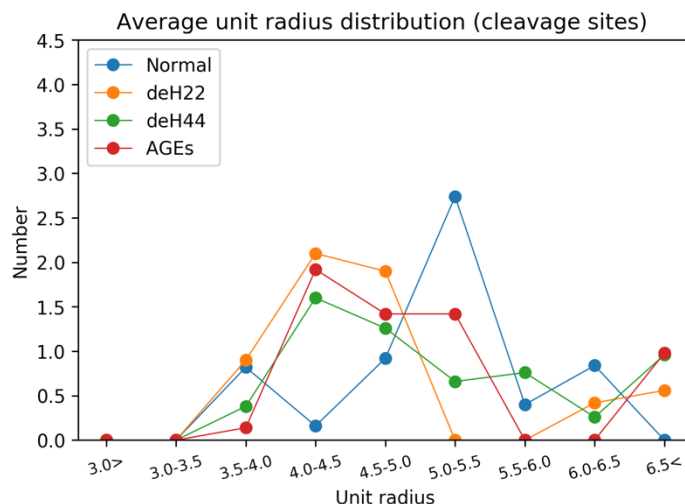


圖 4-12 在 1atm 下，樣本時間內降解區域所有 radius 的平均分佈。

由過果發現 Normal radius 在 5.0~5.5 有一個峰值，代表 Normal 的 radius 在 1atm 下分佈在 5.0~5.5 間，而 4.0~4.5 則較少，其他 deH22、deH44、AGEs 分佈則較類似，大多分佈 4.0~4.5 之間。接下來我們來分析在降解區域的氨基酸序列中，radius 的分佈，如圖 4-13 所示。

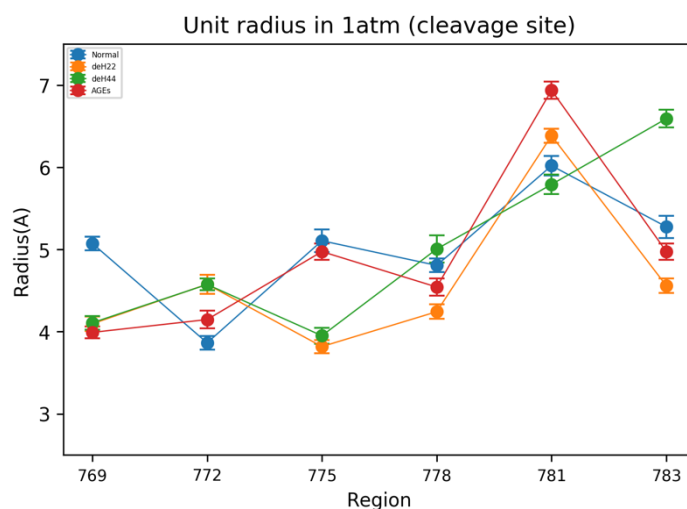


圖 4-13 在 1atm 下，降解區域的 radius 分佈。

resid⁷⁷⁵ 是酵素主要的切割位置，如果 radius 越大則越容易被切割，相反的越

小越不容易被切割，由結果發現在 resid^{775} 的地方，Normal、AGEs 的 radius 較大而 deH22、deH44 較小的結果，表示在 1atm 下，Normal、AGEs 在 resid^{775} 有解開的現象，被酵素接上並切割的機會較大，而 deH22、deH44 則較小不容易被接上並被切割。再來分析在 60MPa 下，分析樣本時間 7ns-10ns 每階段 radius 的變化，如圖 4-14 所示。

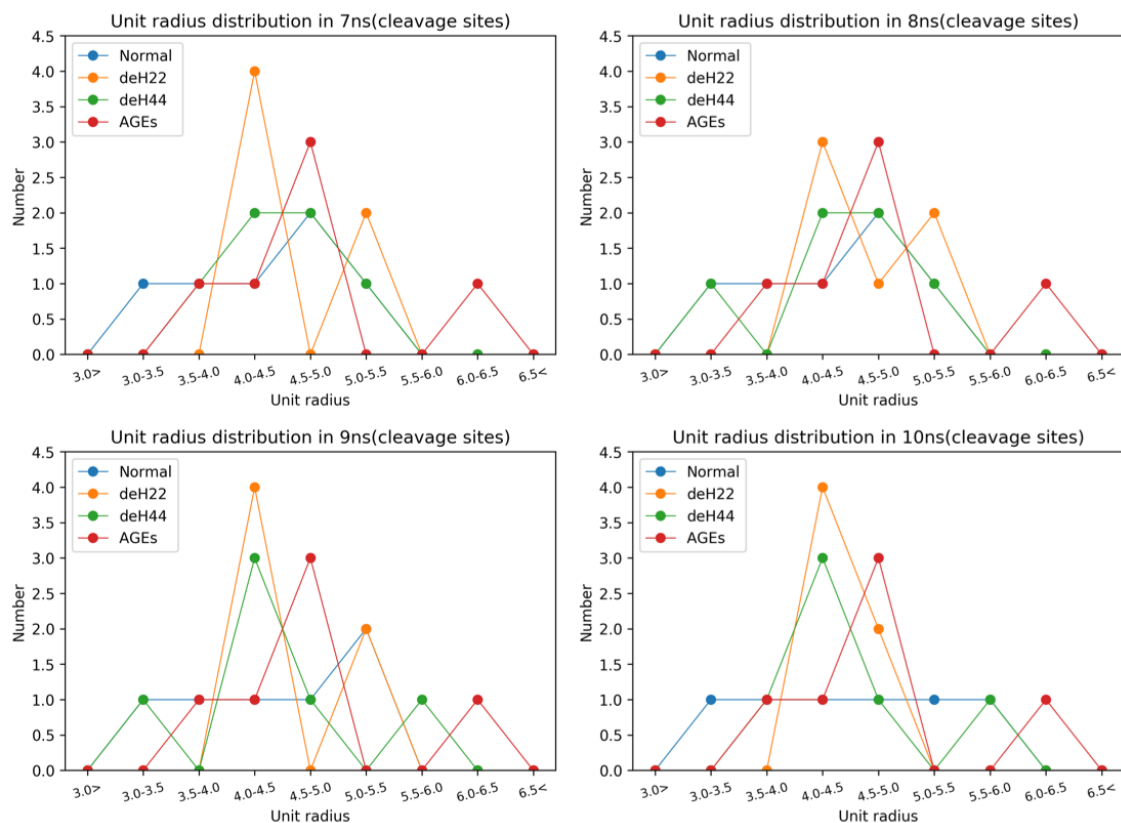


圖 4-14 在 60MPa 下，降解區域 7ns-10ns 的 radius 分佈。

在受到外力 60MPa 平衡的過程中，每個模型的分佈也不盡相同，Normal 模型分佈的較為平均，而 deH22 在 4.0~4.5 之間有明顯的峰值，並且 4.5~5.0 和 5.0~5.5 之間的峰值會來回震盪，deH44 則集中在 3.5~5.5 之間，AGEs 在集中在 4.5~5.0。

接著我們把降解區域在時間內的所有 radius 做平均後在分類，如圖 4-15 所示。

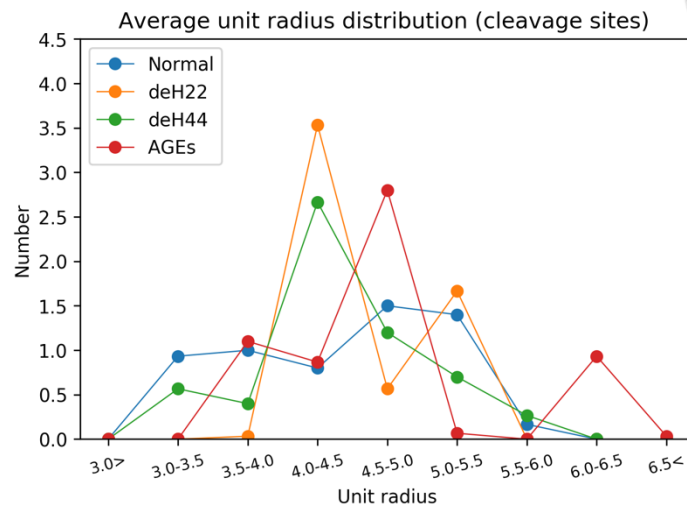


圖 4-15 在 60MPa 下，樣本時間內降解區域所有距離平均的 radius 分佈。

在 60MPa 下，Normal 分佈較為平均，deH22 集中在在 4.0~5.5，deH44 的峰值和 deH22 一樣也是集中在 4.0~4.5，不過整體分佈較為均勻，AGEs 的峰值在 4.5~5.0，並且在 6.0~6.5 有機率會出現。接下來分析在降解區域的氨基酸序列中 radius 的分佈，如圖 4-16 所示。

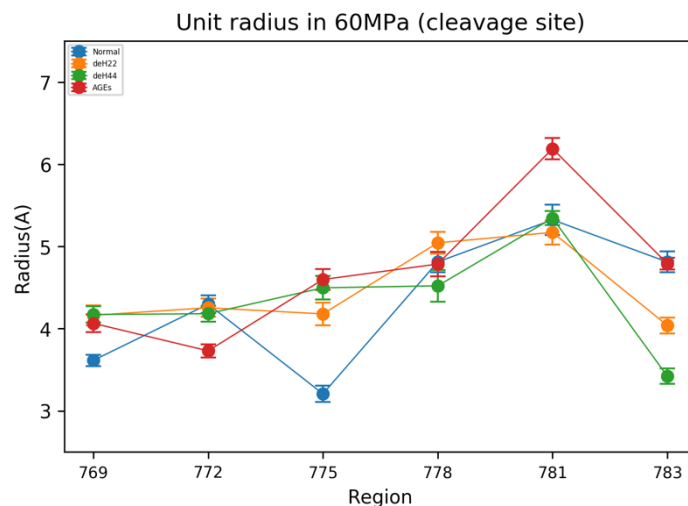


圖 4-16 在 60MPa 下，降解區域的 radius 分佈。

我們分析在 resid⁷⁷⁵ 的 radius，發現在受力之後 Normal 的 radius 變小，deH22、deH44 變大，而 AGEs 不變，並且 AGEs 在 781 的地方有明顯的解開現象，此結果顯示，相較於其他三個模型，Normal 受力的情況下 resid⁷⁷⁵ 會是最短的模型，意味著酵素不容易接上並且將其切割。

4.4 降解區域 hydrogen bond 分析

首先我們先分析在 1atm 下，在降解區域的氫鍵總數，如圖 4-17 所示。

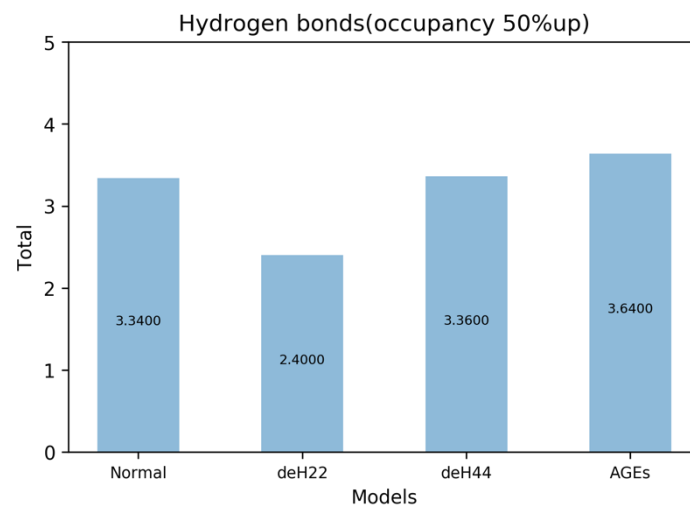


圖 4-17 在 1atm 下，降解區域的氫鍵總數。

由結果看到在 1atm 下，AGEs 在樣本時間中擁有 3.64 個氫鍵最高，其次是 deH44 的 3.36 個氫鍵，再來是 Normal 的 3.34 個氫鍵，最後是 deH22 的 2.4 個氫鍵，AGEs 的氫鍵數略多於 Normal 和 deH44，而 deH22 最少，少了快一個氫鍵。

接下來分析在 60MPa 下，在降解區域的氫鍵總數，如圖 4-18 所示。

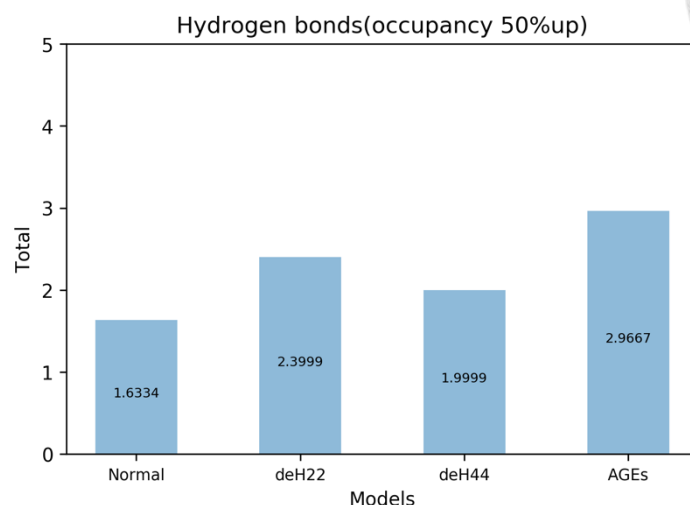


圖 4-18 在 60MPa 下，降解區域的氫鍵總數。

由結果看到在 1atm 下，AGEs 在樣本時間中擁有 2.96 個氫鍵最高，其次是 deH22 的 2.39 個氫鍵，再來是 deH44 的 1.99 個氫鍵，最後是 Normal 的 1.63 個氫鍵，AGE 最多，deH22 比 AGEs 稍微少一點，deH44 和最少的 Normal 少至少一個氫鍵。

接下來分析在這些氫鍵中哪些是主鏈相連哪些是鄰近相連，如表 4-1 所示。

Model	鄰近相連	主鏈相連	總和	主鏈相差
1atm-Normal	0.96	2.38	3.34	-
1atm-deH22	0	2.4	2.4	-
1atm-deH44	0	3.36	3.36	-
1atm-AGEs	0	3.64	3.64	-
60MPa-Normal	0	1.6334	1.6334	-0.7466
60MPa-deH22	0.6333	1.7666	2.3999	-0.6334
60MPa-deH44	0.5333	1.4666	1.9999	-1.8934
60MPa-AGEs	0	2.9667	2.9667	-0.6733

表 4-1 在 1atm，60MPa 下，各模型氫鍵整理。

在 1atm 下，雖然總和的氫鍵最少的是 deH22，但是單獨看主鏈相連的部分，Normal 和 deH22 是差不多的，而 deH44 和 AGEs 和他們差一個氫鍵左右，而 Normal 有一個穩定相連的氫鍵。再來是 60MPa 的情況，AGEs 在主鏈上最多，其次是 Normal 和 deH22，最後是 deH44 最少，而在 deH22 和 deH44 有形成相鄰的氫鍵。隨著外力的拉伸，主鏈的氫鍵是減少的，其中 deH44 減少最多約為兩個氫鍵，其餘三個差不多為 0.6~0.7 左右個氫鍵，說明外力是不利於結構內穩定的因素。

4.5 結果與討論

綜合本章節的結果，我們分析降解區域的頭尾端距可以知道應力為降解區域的影響是否敏感，分析降解區域的 unit height 可以看出酵素作用區域空間的分佈以及大小，分析 radius 可以看出酵素接上膠原蛋白的難易程度，而在 hydrogen bonds 可以觀察氨基酸鏈以及三股螺旋結構的變化。

由頭尾端距的結果來看，在 1atm 下降解區域長度大小為：deH22 > deH44 > Normal > AGEs，而在 60MPa 下的長度大小為：Normal > deH44 > deH22 > AGEs，進一步分析伸長量與應變大小：Normal > deH44 > AGEs > deH22，結果顯示 Normal 模型中的降解區域對應力的敏感度為最高，而其次依序為 deH44、AGEs 和 deH22，不過 deH22 可能因為是分子的伸長量原本就較少，所以分佈下來的伸長量也較少。

Unit height 的分析來看，發現 unit height 的標準差很大，在平衡的狀態下原子會有動能讓分子自然振動，由平均的 unit height 分佈可以看到從 1atm 到 60MPa 的分佈從 8.0~8.5 之間，轉換到 8.5~9.0 之間。依序列來分析，在 1atm 下，除了 deH22 在 resid⁷⁸¹~resid⁷⁸³ 有較長的趨勢，其餘四個模型的趨勢是差不多的，在 60MPa 下，deH22 和 AGEs 在 resid⁷⁷⁵~resid⁷⁷⁸ 有稍微變大，但趨勢其實是差不多的，但是 Normal 和 deH44 的分佈改變了，在 resid⁷⁷²~resid⁷⁷⁵、resid⁷⁷⁵~resid⁷⁷⁸ 減少，然後在 resid⁷⁷⁸~resid⁷⁸¹ 明顯增多，結果顯示在受力下，所受的變形會依照不同交聯鍵程度來表現。

Radius 代表酵素接上去的難易程度，由於膠原蛋白分子的三股螺旋結構會保護膠原蛋白不被輕易降解，所以 radius 的大小相對重要。Radius 的標準差較小，說明在平衡期間 radius 變化較小、較穩定。

綜合以上結果，如果要被酵素有效的切割，radius 越大越容易被接上並且被切割，在 1atm 下，Normal 和 AGEs 在 resid⁷⁷⁵ 比 deH22 和 deH44 來的大，意味著 Normal 和 AGEs 在無受力的情況下較容易被切割，而在 60MPa 下，deH22、deH44 和 AGEs 在 resid⁷⁷⁵ 比 Normal 大上許多，代表 Normal 在受力的情況下 radius 變小，讓酵素難以接上並將其切割，這也符合先前的實驗結果[81]，而 AGEs 在 resid⁷⁸¹ 有明顯地解開現象，原因可能是附近是 AGEs 交聯鍵產生的解開現象。

而由結果推測，沒受力的情況下，Normal 和 AGEs 在纖維中是較為容易被降

解的，deH22 和 deH44 則不容易被降解，但是在 60MPa 下，deH22、deH44 和 AGEs 較容易被降解，而 Normal 較不容易被降解。

氫鍵代表結構的穩定，分為主鏈相連和鄰近相連的氫鍵，主鏈相連的氫鍵代表三股螺旋結構的穩定，鄰近相連的氫鍵代表氨基酸鏈螺旋構型的穩定，由結果來看，膠原蛋白纖維在受力之後，主鏈相連的氫鍵都減少了，說明在外力下，不利於主鏈相連的氫鍵發生。在 1atm 下，主鏈相連的氫鍵數量：AGEs > deH44 > deH22 > Normal，而相鄰相連的氫鍵只有 Normal 有穩定的氫鍵，而在 60MPa 下，主鏈相連的氫鍵數量：AGEs > deH22 > Normal > deH44，而 deH22 和 deH44 有形成相鄰相連的氫鍵。

第5章、 結論與未來展望



5.1 總結

本研究透過分子動力模擬，研究不同交聯鍵以及質量密度對膠原蛋白纖維的影響。我們選擇酵素所形成的 dehydro-lysino-norleucine crosslink 以及非酵素所形成的 Glucosepane crosslink 作為膠原蛋白纖維的交聯鍵，並建立 Normal、deH22、deH44 與 AGEs 四種不同交聯鍵形式組成的模型。藉由分析變形以及滑動的機制，讓我們了解不同交聯鍵分佈對膠原蛋白纖維的結構以及力學行為的變化。並透過降解區域的結構分析，也讓我們了解在纖維尺度中交聯鍵是如何影響膠原蛋白分子的降解。總結如下：

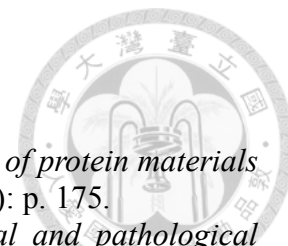
1. Unit cell 長度在 1atm 下 Normal 最長、AGEs 最短，而在 60MPa 下 deH44 最長、deH22 最短。在未受力情況下有交聯鍵的 D-period 會較短，代表交聯鍵在平衡過程中的對齊會讓 overlap 或 gap 縮短，而在受力的情況下會因為不同交聯鍵形式而有不同變形機制。
2. 分子頭尾端距在 1atm 下長度大小 Normal > deH22 > deH44 > AGEs，在 60MPa 下的長度大小 deH44 > Normal > AGEs > deH22，伸長量大小為 deH44 > AGEs > Normal > deH22。雖然 Normal 受 60MPa 下長度僅次於 deH44，但伸長量比 AGEs 來得少。由結果來看如果外力增加有交聯鍵的纖維伸長量會較大，也說明有交聯鍵的纖維受到外力後拉伸會較明顯，尤其是 AGEs 這種連接方式受到外力反應也較為敏感。
3. Overlap 和 gap 的分析讓我們了解膠原蛋白纖維在不同應力和不同交聯鍵的情況下，分子對齊的情況也會不同。由 overlap/gap ratio 來看，在 1atm 下四個模型是差不多的，但在 60MPa 下 deH22 和 deH44 下降較多，由結果來看在 N、C 兩端的交聯鍵在受力之後的表現類似。進一步分析 overlap 和 gap 的長度變化，deH22 在 overlap 的伸長量最少而 deH44 則是 gap 伸長量最多。
4. 透過膠原蛋白纖維與氨基酸殘基的分佈圖可以知道交聯鍵如何影響分子滑動。在 1atm 下有交聯鍵的地方會因為對齊而被拉伸導致交聯鍵附近的氨基酸殘基減少，而在 60MPa 下會因為交聯鍵的位置有不同的分佈，不過 deH22 和 deH44 的氨基酸殘基明顯在 overlap 減少而 gap 增加，AGEs 則不明顯。

- 
5. 降解區域的頭尾端距的變化可以反應對應力的敏感度，從 1atm 到 60MPa 伸長量最多的是 Normal，而其次依序為 deH44、AGEs 和 deH22，不過 deH22 可能因為是分子的伸長量原本就較少，所以分佈下來的伸長量也較少。由結果顯示交聯鍵會影響降解區域對外力的敏感度。
 6. 在沒外力下分析切割位置 resid⁷⁷⁵ 的 radius，Normal 和 AGEs 半徑比 deH22 和 deH44 大，而在 60MPa 下 Normal 的 radius 明顯下降，deH22 和 deH44 則是上升和 AGEs 差不多。由結果顯示 Normal 在受力之後 radius 明顯下降，代表酵素作用難度增加和實驗結果相符[81]。在 N、C 兩端有交聯鍵的纖維會隨著外力上升 radius 也會跟著上升，而 AGEs 在 resid⁷⁷⁵ 的 radius 則是一直處於較大的狀態。
 7. 降解區域的氫鍵會隨著外力增加而減少，代表受力後結構穩定不是因為氫鍵的偶極力而是結構本身的特性。

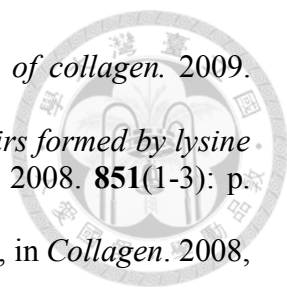
5.2 未來展望

本研究透過分子動力模擬來了解不同交聯鍵以及質量密度的膠原蛋白纖維的力學行為、結構特性。接下來可以更深入了解細胞和膠原蛋白纖維的互相作用機制，例如先前的研究發現細胞膜器 $\beta 1$ integrin 是膠原蛋白纖維的受體，近年來發現一些生長因子如 TGF- β 含量的變異，會讓 $\beta 1$ integrin 改變膠原蛋白纖維的排列或堆疊，最後導致癌症的發生[96, 97]。未來也期望能利用分子動力模擬，探討膠原蛋白組織的疾病機制，提供藥物以及治療的幫助。

參考資料



1. Buehler, M.J. and Y.C.J.N.m. Yung, *Deformation and failure of protein materials in physiologically extreme conditions and disease*. 2009. **8**(3): p. 175.
2. Gautieri, A., et al., *Mechanical properties of physiological and pathological models of collagen peptides investigated via steered molecular dynamics simulations*. 2008. **41**(14): p. 3073-3077.
3. Rainey, J.K., C.K. Wen, and M.C.J.M.b. Goh, *Hierarchical assembly and the onset of banding in fibrous long spacing collagen revealed by atomic force microscopy*. 2002. **21**(8): p. 647-660.
4. Gronau, G., et al., *A review of combined experimental and computational procedures for assessing biopolymer structure–process–property relationships*. 2012. **33**(33): p. 8240-8255.
5. De Simone, A., et al., *Role of hydration in collagen triple helix stabilization*. 2008. **372**(1): p. 121-125.
6. Brodsky, B. and J.A.J.M.B. Ramshaw, *The collagen triple-helix structure*. 1997. **15**(8-9): p. 545-554.
7. Chen, M.L., J.W. Ruberti, and T.D.J.J.o.t.m.b.o.b.m. Nguyen, *Increased stiffness of collagen fibrils following cyclic tensile loading*. 2018. **82**: p. 345-354.
8. Quinn, T., V.J.B. Morel, and m.i. mechanobiology, *Microstructural modeling of collagen network mechanics and interactions with the proteoglycan gel in articular cartilage*. 2007. **6**(1-2): p. 73-82.
9. Bell, J., et al., *The hierarchical response of human corneal collagen to load*. 2018. **65**: p. 216-225.
10. Holmes, D.F., et al., *Corneal collagen fibril structure in three dimensions: structural insights into fibril assembly, mechanical properties, and tissue organization*. 2001. **98**(13): p. 7307-7312.
11. Bancelin, S., et al., *Ex vivo multiscale quantitation of skin biomechanics in wild-type and genetically-modified mice using multiphoton microscopy*. 2015. **5**: p. 17635.
12. Gautieri, A., et al., *Hierarchical structure and nanomechanics of collagen microfibrils from the atomistic scale up*. 2011. **11**(2): p. 757-766.
13. Nair, A.K., et al., *Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone*. 2013. **4**: p. 1724.
14. McNally, E.A., et al., *A model for the ultrastructure of bone based on electron microscopy of ion-milled sections*. 2012. **7**(1): p. e29258.
15. Orgel, J.P., et al., *The in situ supermolecular structure of type I collagen*. 2001. **9**(11): p. 1061-1069.
16. Tao, J., et al., *Energetic basis for the molecular-scale organization of bone*. 2015. **112**(2): p. 326-331.
17. Yang, W., M.A. Meyers, and R.O.J.P.i.M.S. Ritchie, *Structural architectures with toughening mechanisms in Nature: A review of the materials science of Type-I collagenous materials*. 2019.
18. Brodsky, B., et al., *Triple-helical peptides: An approach to collagen conformation, stability, and self-association*. 2008. **89**(5): p. 345-353.
19. Li, M.H., et al., *Two-dimensional NMR assignments and conformation of (Pro-Hyp-Gly) 10 and a designed collagen triple-helical peptide*. 1993. **32**(29): p. 7377-7387.
20. Punitha, V., et al., *Molecular dynamics investigations on the effect of D amino*

- 
- acid substitution in a triple-helix structure and the stability of collagen. 2009. **113**(26): p. 8983-8992.
21. Raman, S.S., et al., *A molecular dynamics analysis of ion pairs formed by lysine in collagen: implication for collagen function and stability*. 2008. **851**(1-3): p. 299-312.
 22. Fratzl, P., *Collagen: structure and mechanics, an introduction*, in *Collagen*. 2008, Springer. p. 1-13.
 23. Minary-Jolandan, M. and M.-F.J.B. Yu, *Nanomechanical heterogeneity in the gap and overlap regions of type I collagen fibrils with implications for bone heterogeneity*. 2009. **10**(9): p. 2565-2570.
 24. Prockop, D.J. and A.J.J.o.s.b. Fertala, *The collagen fibril: the almost crystalline structure*. 1998. **122**(1-2): p. 111-118.
 25. Veis, A.J.C.O.i.S.S. and M. Science, *Collagen fibrillar structure in mineralized and nonmineralized tissues*. 1997. **2**(3): p. 370-378.
 26. Fratzl, P., et al., *Fibrillar structure and mechanical properties of collagen*. 1998. **122**(1-2): p. 119-122.
 27. Habelitz, S., et al., *In situ atomic force microscopy of partially demineralized human dentin collagen fibrils*. 2002. **138**(3): p. 227-236.
 28. Van Der Rijt, J.A., et al., *Micromechanical testing of individual collagen fibrils*. 2006. **6**(9): p. 697-702.
 29. Shen, Z.L., et al., *Stress-strain experiments on individual collagen fibrils*. 2008. **95**(8): p. 3956-3963.
 30. Graham, J.S., et al., *Structural changes in human type I collagen fibrils investigated by force spectroscopy*. 2004. **299**(2): p. 335-342.
 31. Avery, N., A.J.S.j.o.m. Bailey, and s.i. sports, *Enzymic and non-enzymic cross-linking mechanisms in relation to turnover of collagen: relevance to aging and exercise*. 2005. **15**(4): p. 231-240.
 32. Wang, X., et al., *Age-related changes in the collagen network and toughness of bone*. Bone, 2002. **31**(1): p. 1-7.
 33. Verzijl, N., et al., *Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: A possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis*. 2002. **46**(1): p. 114-123.
 34. Chen, A.C., et al., *Induction of advanced glycation end products and alterations of the tensile properties of articular cartilage*. 2002. **46**(12): p. 3212-3217.
 35. Karim, L. and M.L. Bouxsein, *Effect of type 2 diabetes-related non-enzymatic glycation on bone biomechanical properties*. Bone, 2016. **82**: p. 21-27.
 36. Robins, S.P., *Biochemistry and functional significance of collagen cross-linking*. Biochemical Society Transactions, 2007. **35**(5): p. 849.
 37. Eyre, D.R., M.A. Paz, and P.M. Gallop, *CROSS-LINKING IN COLLAGEN AND ELASTIN*. 1984. **53**(1): p. 717-748.
 38. Tierney, C.M., et al., *The effects of collagen concentration and crosslink density on the biological, structural and mechanical properties of collagen-GAG scaffolds for bone tissue engineering*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2009. **2**(2): p. 202-209.
 39. Buehler, M.J., *Nanomechanics of collagen fibrils under varying cross-link densities: Atomistic and continuum studies*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2008. **1**(1): p. 59-67.
 40. Depalle, B., et al., *Influence of cross-link structure, density and mechanical*

- properties in the mesoscale deformation mechanisms of collagen fibrils*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2015. **52**: p. 1-13.
41. Lin, S. and L. Gu, *Influence of Crosslink Density and Stiffness on Mechanical Properties of Type I Collagen Gel*. 2015. **8**(2): p. 551-560.
 42. Kwansa, A.L., R. De Vita, and J.W. Freeman, *Tensile mechanical properties of collagen type I and its enzymatic crosslinks*. Biophysical Chemistry, 2016. **214-215**: p. 1-10.
 43. Kwansa, A.L., R. De Vita, and J.W. Freeman, *Mechanical recruitment of N- and C-crosslinks in collagen type I*. Matrix Biology, 2014. **34**: p. 161-169.
 44. Uzel, S.G.M. and M.J. Buehler, *Molecular structure, mechanical behavior and failure mechanism of the C-terminal cross-link domain in type I collagen*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2011. **4**(2): p. 153-161.
 45. Francis-Sedlak, M.E., et al., *Characterization of type I collagen gels modified by glycation*. Biomaterials, 2009. **30**(9): p. 1851-1856.
 46. Fu, M.-X., et al., *Glycation, Glycoxidation, and Cross-Linking of Collagen by Glucose: Kinetics, Mechanisms, and Inhibition of Late Stages of the Maillard Reaction*. Diabetes, 1994. **43**(5): p. 676.
 47. Van Nguyen, C., *Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological-AGEs*. 2006. **50**(12): p. 1140-1149.
 48. Saito, M. and K.J.O.i. Marumo, *Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus*. 2010. **21**(2): p. 195-214.
 49. Monnier, V.M., et al., *Cross-linking of the extracellular matrix by the maillard reaction in aging and diabetes: an update on "a puzzle nearing resolution"*. 2005. **1043**(1): p. 533-544.
 50. Sell, D.R., et al., *Glucosepane Is a Major Protein Cross-link of the Senescent Human Extracellular Matrix: RELATIONSHIP WITH DIABETES*. 2005. **280**(13): p. 12310-12315.
 51. Reiser, K.M., *Nonenzymatic Glycation of Collagen in Aging and Diabetes*. 1991. **196**(1): p. 17-29.
 52. Baynes, J.W., *The role of AGEs in aging: causation or correlation*. Experimental Gerontology, 2001. **36**(9): p. 1527-1537.
 53. Snedeker, J.G., A.J.M. Gautieri, ligaments, and t. journal, *The role of collagen crosslinks in ageing and diabetes-the good, the bad, and the ugly*. 2014. **4**(3): p. 303.
 54. Schmidt, F., et al., *Assessment of collagen quality associated with non-enzymatic cross-links in human bone using Fourier-transform infrared imaging*. 2017. **97**: p. 243-251.
 55. Haus, J.M., et al., *Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle*. 2007. **103**(6): p. 2068-2076.
 56. Bai, P., et al., *Glycation alters collagen fibril organization*. 1992. **28**(1-2): p. 1-12.
 57. Vashishth, D., et al., *Influence of nonenzymatic glycation on biomechanical properties of cortical bone*. 2001. **28**(2): p. 195-201.
 58. Couppe, C., et al., *Mechanical properties and collagen cross-linking of the patellar tendon in old and young men*. 2009. **107**(3): p. 880-886.
 59. Monnier, V.M., et al., *The mechanism of collagen cross-linking in diabetes: a puzzle nearing resolution*. 1996. **45**(Supplement 3): p. S67-S72.
 60. Saito, M., et al., *Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats*. 2006.

- 17(10): p. 1514-1523.
61. Andreassen, T., K. Seyer-Hansen, and A.J.B.e.B.A.-G.S. Bailey, *Thermal stability, mechanical properties and reducible cross-links of rat tail tendon in experimental diabetes*. 1981. **677**(2): p. 313-317.
 62. Zimmermann, E.A., et al., *Age-related changes in the plasticity and toughness of human cortical bone at multiple length scales*. 2011. **108**(35): p. 14416-14421.
 63. Viguet-Carrin, S., et al., *Contribution of the advanced glycation end product pentosidine and of maturation of type I collagen to compressive biomechanical properties of human lumbar vertebrae*. 2006. **39**(5): p. 1073-1079.
 64. Hernandez, C.J., et al., *Trabecular microfracture and the influence of pyridinium and non-enzymatic glycation-mediated collagen cross-links*. 2005. **37**(6): p. 825-832.
 65. Collier, T., et al., *Effect on the mechanical properties of type I collagen of intramolecular lysine-arginine derived advanced glycation end-product cross-linking*. 2018. **67**: p. 55-61.
 66. Collier, T.A., et al., *Preferential sites for intramolecular glucosepane cross-link formation in type I collagen: A thermodynamic study*. 2015. **48**: p. 78-88.
 67. Reddy, G.K.J.E.D.R., *Cross-linking in collagen by nonenzymatic glycation increases the matrix stiffness in rabbit achilles tendon*. 2004. **5**(2): p. 143-153.
 68. Li, Y., et al., *Advanced glycation end-products diminish tendon collagen fiber sliding*. 2013. **32**(3-4): p. 169-177.
 69. Gautieri, A., et al., *Age- and diabetes-related nonenzymatic crosslinks in collagen fibrils: Candidate amino acids involved in Advanced Glycation End-products*. Matrix Biology, 2014. **34**: p. 89-95.
 70. McCarthy, A.D., et al., *Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress*. BMC Cell Biology, 2001. **2**(1): p. 16.
 71. Perumal, S., O. Antipova, and J.P.J.P.o.t.N.A.o.S. Orgel, *Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolysis*. 2008. **105**(8): p. 2824-2829.
 72. Riley, G.P., et al., *Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology*. 2002. **21**(2): p. 185-195.
 73. Manka, S.W., et al., *Structural insights into triple-helical collagen cleavage by matrix metalloproteinase 1*. 2012. **109**(31): p. 12461-12466.
 74. Sweeney, S.M., et al., *Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates*. 2008. **283**(30): p. 21187-21197.
 75. Chung, L., et al., *Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis*. 2004. **23**(15): p. 3020-3030.
 76. Chang, S.-W. and M.J.J.M.T. Buehler, *Molecular biomechanics of collagen molecules*. 2014. **17**(2): p. 70-76.
 77. Chang, S.-W., et al., *Molecular mechanism of force induced stabilization of collagen against enzymatic breakdown*. 2012. **33**(15): p. 3852-3859.
 78. Gautieri, A., M.J. Buehler, and A.J.J.o.t.M.B.o.B.M. Redaelli, *Deformation rate controls elasticity and unfolding pathway of single tropocollagen molecules*. 2009. **2**(2): p. 130-137.
 79. Huang, C. and I.J.J.o.b.m.r. Yannas, *Mechanochemical studies of enzymatic degradation of insoluble collagen fibers*. 1977. **11**(1): p. 137-154.
 80. Pashley, D.H., et al., *Collagen degradation by host-derived enzymes during aging*.

2004. **83**(3): p. 216-221.
81. Bourne, J.W., J.M. Lippell, and P.A.J.M.B. Torzilli, *Glycation cross-linking induced mechanical–enzymatic cleavage of microscale tendon fibers*. 2014. **34**: p. 179-184.
 82. Bourne, J.W. and P.A.J.M.B. Torzilli, *Molecular simulations predict novel collagen conformations during cross-link loading*. 2011. **30**(5-6): p. 356-360.
 83. Alder, B.J. and T.E.J.T.J.o.C.P. Wainwright, *Studies in molecular dynamics. I. General method*. 1959. **31**(2): p. 459-466.
 84. Rahman, A.J.P.r., *Correlations in the motion of atoms in liquid argon*. 1964. **136**(2A): p. A405.
 85. Irving, J. and J.G.J.T.J.o.c.p. Kirkwood, *The statistical mechanical theory of transport processes. IV. The equations of hydrodynamics*. 1950. **18**(6): p. 817-829.
 86. Pearlman, D.A., et al., *AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules*. Computer Physics Communications, 1995. **91**(1): p. 1-41.
 87. MacKerell, A.D., et al., *All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins*. The Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(18): p. 3586-3616.
 88. Buehler, M.J., *Atomistic modeling of materials failure*. 2008: Springer Science & Business Media.
 89. Andersen, H.C.J.T.J.o.c.p., *Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature*. 1980. **72**(4): p. 2384-2393.
 90. Allen, M.P. and D.J. Tildesley, *Computer simulation of liquids*. 2017: Oxford university press.
 91. Frenkel, D., et al., *Understanding molecular simulation*. 1997. **11**(4): p. 351-354.
 92. Fang, M. and M.M.B.J.B.r. Holl, *Variation in type I collagen fibril nanomorphology: the significance and origin*. 2013. **2**.
 93. Hulmes, D., et al., *Radial packing, order, and disorder in collagen fibrils*. 1995. **68**(5): p. 1661-1670.
 94. Orgel, J.P., et al., *Microfibrillar structure of type I collagen in situ*. 2006. **103**(24): p. 9001-9005.
 95. Chang, S.-W., S.J. Shefelbine, Markus J. Buehler *Structural and mechanical differences between collagen homo-and heterotrimers: relevance for the molecular origin of brittle bone disease*. 2012. **102**(3): p. 640-648.
 96. Seales, E.C., et al., *Hypersialylation of β 1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility*. 2005. **65**(11): p. 4645-4652.
 97. Wei, S.C., et al., *Matrix stiffness drives epithelial–mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1–G3BP2 mechanotransduction pathway*. 2015. **17**(5): p. 678.