



**GDAŃSK UNIVERSITY  
OF TECHNOLOGY**

Imię i nazwisko autora rozprawy: Paweł Chodnicki  
Dyscyplina naukowa: Chemia

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

Tytuł rozprawy w języku polskim: **Rola niedopasowania hydrofobowego w funkcjach biologicznych błon lipidowych**

Tytuł rozprawy w języku angielskim: **The role of hydrophobic mismatch in the biological functions of lipid membranes**

Promotor

*podpis*

prof. dr hab. inż. Jacek Czub

Gdańsk, 2024



## OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: Paweł Chodnicki

Ja, niżej podpisany, oświadczam, iż jestem świadomy, że zgodnie z przepisem art. 27 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (t.j. Dz.U. z 2021 poz. 1062), uczelnia może korzystać z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej:

**„Rola niedopasowania hydrofobowego w funkcjach biologicznych błon lipidowych”** do prowadzenia badań naukowych lub w celach dydaktycznych.<sup>1</sup>

Świadomy odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021.478 t.j.), a także odpowiedzialności cywilnoprawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem prof. dr hab. inż Jackiem Czubem.

Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami, zgodnie z przepisem art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych.

Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia 30.04.2024 r.

.....  
*podpis doktoranta*

Ja, niżej podpisany(a), wyrażam zgodę na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej.

Gdańsk, dnia 30.04.2024 r.

.....  
*podpis doktoranta*

<sup>1</sup> Art. 27. 1. Instytucje oświatowe oraz podmioty, o których mowa w art. 7 ust. 1 pkt 1, 2 i 4-8 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, mogą na potrzeby zilustrowania treści przekazywanych w celach dydaktycznych lub w celu prowadzenia działalności naukowej korzystać z rozpowszechnionych utworów w oryginale i w tłumaczeniu oraz zwielokrotnić w tym celu rozpowszechnione drobne utwory lub fragmenty większych utworów.

2. W przypadku publicznego udostępniania utworów w taki sposób, aby każdy mógł mieć do nich dostęp w miejscu i czasie przez siebie wybranym korzystanie, o którym mowa w ust. 1, jest dozwolone wyłącznie dla ograniczonego kręgu osób uczących się, nauczających lub prowadzących badania naukowe, zidentyfikowanych przez podmioty wymienione w ust. 1.





## **OPIS ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**Autor rozprawy doktorskiej:** Paweł Chodnicki

**Tytuł rozprawy w języku polskim:** Rola niedopasowania hydrofobowego w funkcjach biologicznych błon lipidowych

**Tytuł rozprawy w języku angielskim:** The role of hydrophobic mismatch in the biological functions of lipid membranes

**Język rozprawy doktorskiej:** polski

**Promotor rozprawy doktorskiej:** prof. dr hab. inż. Jacek Czub

**Data obrony:**

**Słowa kluczowe rozprawy w języku polskim:** niedopasowanie hydrofobowe, błony biologiczne, asocjacja, segregacja inkluzji, symulacje dynamiki molekularnej

**Słowa kluczowe rozprawy w języku angielskim:** hydrophobic mismatch, biological membranes, association, inclusion segregation, molecular dynamics simulations

**Streszczenie rozprawy w języku polskim:**

Błony biologiczne czerpią swoją funkcjonalność przede wszystkim z białek i innych inkluzji, których funkcjonowanie zależy od składu lipidowego błony. Różnorodny skład lipidów może prowadzić do wystąpienia niedopasowania hydrofobowego – różnicy między długością inkluzji a grubością błony. Minimalizacja tego niekorzystnego energetycznie efektu prowadzić może do asocjacji inkluzji a czasem także ich reorientacji lub segregacji do innej domeny błonowej. Eksperymentalnie potwierdzono istotną rolę niedopasowania hydrofobowego w wielu kluczowych procesach biologicznych, choć molekularne podłoże tej zależności pozostaje niejasne. W mojej pracy zbadałem energetykę procesu tworzenia niedopasowania hydrofobowego oraz jego wpływ na asocjację i segregację inkluzji między domenami błonowymi o różnym stopniu uporządkowania. Wykazałem, że stabilność dimerów inkluzji jest proporcjonalna do wielkości ujemnego niedopasowania hydrofobowego a dodatkowa stabilizacja wynika z redukcji liczby niekorzystnych kontaktów między wodą a lipidami błony. Ponadto wykazałem, że niedopasowanie hydrofobowe ma kluczowe znaczenie dla preferencyjnego lokalizowania się w jednej z domen, co również wynika z minimalizacji kontaktów między wodą a błoną. Uzyskane wnioski potwierdziłem poprzez analizę roli niedopasowania hydrofobowego w szeregu istotnych biologicznie procesów błonowych.





**Streszczenie rozprawy w języku angielskim:**

Biological membranes derive their functionality primarily from proteins and other inclusions, whose function depends on the lipid composition of the membrane. Diverse lipid composition can lead to hydrophobic mismatch -- a difference between the length of the inclusion and the thickness of the membrane. Minimizing this energetically unfavorable effect can lead to association, reorientation, or partitioning of inclusions into another membrane domain. The significant role of hydrophobic mismatch in many key biological processes has been experimentally confirmed, although the molecular basis of this relation remains unclear. In my work, I examined the energetics of hydrophobic mismatch formation and its impact on inclusion association and segregation between membrane domains with varying degrees of conformational order. At the molecular level, I demonstrated that the stability of inclusion dimers is proportional to the magnitude of negative hydrophobic mismatch, with additional stabilization resulting from reducing unfavorable contacts between water and membrane lipids. Furthermore, I showed that hydrophobic mismatch is crucial for preferential localization within one domain, which also arises from minimizing contacts between water and lipids. The conclusions drawn were confirmed through an analysis of the role of hydrophobic mismatch in a set of biologically significant membrane processes.



## Podziękowania

*Chciałbym serdecznie podziękować mojemu promotorowi, Profesorowi Jackowi Czubowi, za ogromny wkład w proces tworzenia rozprawy doktorskiej oraz za cenne rozmowy, które wykraczały poza obszar naukowy. Dziękuję również wszystkim kolegom i koleżankom z grupy badawczej, z którą miałem przyjemność współpracować przez ostatnią dekadę.*

*Wielkie podziękowania kieruję także do mojej rodziny, przyjaciół, znajomych oraz wszystkich tych, którzy wspierali mnie w osiągnięciu postawionego przeze mnie celu.*

*Serdecznie dziękuję Narodowemu Centrum Nauki za wsparcie finansowe, które umożliwiło realizację badań w ramach projektu badawczego pt. „W jaki sposób lipidy modulują asocjację i lokalizację białek w obrębie błon lipidowych – badania z zastosowaniem symulacji molekularnych”, o numerze UMO-2021/41/N/ST4/03571.*

*Serdecznie dziękuję Polskiej Infrastrukturze Gridowej PLGrid (HPC Centrum: ACK Cyfronet AGH) za udostępnienie zasobów obliczeniowych w ramach grantu obliczeniowego o numerze PLG/2022/015444. Dziękuję także Centrum Informatycznemu TASK za udostępnienie zasobów obliczeniowych.*

# Spis treści

<b>1</b>	<b>Wprowadzenie</b>	<b>1</b>
1.1	Błona komórkowa jako płynna mozaika . . . . .	1
1.2	Rodzaje oraz budowa lipidów . . . . .	1
1.3	Kluczowe właściwości fizykochemiczne błony . . . . .	2
1.3.1	Grubość błony i niedopasowanie hydrofobowe . . . . .	2
1.3.2	Upakowanie lipidów . . . . .	3
1.4	Sposoby odpowiedzi układu na niedopasowanie hydrofobowe . . . . .	4
1.4.1	Lokalna zmiana grubości błony . . . . .	4
1.4.2	Asocjacja . . . . .	4
1.4.3	Zmiana konformacyjna i reorientacja białka . . . . .	5
1.4.4	Transfer pomiędzy domenami błony . . . . .	5
1.5	Molekularna charakterystyka niedopasowania hydrofobowego oraz dotych- czasowe sposoby jej analizy . . . . .	6
1.5.1	Proste peptydy modelowe . . . . .	6
1.5.2	Rola aminokwasów kotwiczących do błony . . . . .	6
1.5.3	Napięcie liniowe . . . . .	7
1.6	Wybrane przykłady procesów napędzanych przez niedopasowanie hydro- fobowe . . . . .	7
1.6.1	Wiązanie się cholesterolu do peptydów L11 i KALP21 . . . . .	7
1.6.2	Wiązanie się białka prekursorowego amyloidu do $\gamma$ -sekreazy . . . . .	9
1.6.3	Agregacja koniugatów peptyd-antybiotyków w obrębie błon lipidowych . . . . .	11
1.6.4	Wpływ długości hydrofobowej alkoholi na właściwości fizyko- chemiczne błony . . . . .	12
1.6.5	Karotenoidy i ich rola w ochronie oka przed fotouszkodzeniami . . . . .	13
<b>2</b>	<b>Cele oraz zakres pracy</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Metody obliczeniowe</b>	<b>18</b>
3.1	Dynamika molekularna . . . . .	18
3.2	Propagacja ruchu . . . . .	19
3.3	Energia potencjalna układu . . . . .	20
3.3.1	Energia potencjalna oddziaływań wiążących . . . . .	20
3.3.2	Energia potencjalna kątów walencyjnych . . . . .	21
3.3.3	Energia potencjalna obrotów wokół wiązań . . . . .	21
3.3.4	Energia potencjalna oddziaływań dyspersyjnych . . . . .	22



3.3.5	Energia potencjalna oddziaływań elektrostatycznych . . . . .	23
3.3.6	Pole siłowe . . . . .	24
3.4	Wydajność obliczeniowa . . . . .	24
3.4.1	Krok czasowy . . . . .	24
3.4.2	Oddziaływania międzycząsteczkowe . . . . .	25
3.4.3	Wielkość układu . . . . .	26
3.5	Utrzymywanie stałych warunków fizycznych w symulacji . . . . .	28
3.6	Przewidywanie zmian energii swobodnej w procesach biomolekularnych . . .	29
3.6.1	Umbrella Sampling . . . . .	30
3.6.2	Metadynamika . . . . .	32
3.6.3	Techniki alchemiczne . . . . .	34
3.7	Zastosowane protokoły symulacyjne . . . . .	36
3.7.1	Symulacje z wykorzystaniem modelu inkluzji transbłonowej . . . . .	37
3.7.2	Specyficzne wiązanie cholesterolu do peptydów transbłonowych . . .	43
3.7.3	Wiązanie białka prekursorowego amyloidu do $\gamma$ -sekreazy . . . . .	43
3.7.4	Agregacja koniugatów peptyd-antybiotyk w obrębie błon lipidowych	45
3.7.5	Wpływ alkoholi na właściwości fizykochemicznych dwuwarstwy lipidowej . . . . .	46
3.7.6	Reorientacja karotenoidów w błonie . . . . .	46
<b>4</b>	<b>Wyniki oraz ich dyskusja</b>	<b>48</b>
4.1	Skonstruowanie modelu transbłonowej inkluzji . . . . .	48
4.1.1	Motywacja dla utworzenia modelu . . . . .	48
4.1.2	Podsumowanie . . . . .	51
4.2	Molekularne podłoże niedopasowania hydrofobowego . . . . .	52
4.2.1	Koszt energetyczny wytworzenia ujemnego niedopasowania hydro- fobowego . . . . .	52
4.2.2	Zmiana rozkładu cząsteczek wody i lipidów w sąsiedztwie inkluzji w odpowiedzi na wytworzenie ujemnego niedopasowania hydro- fobowego . . . . .	54
4.2.3	Podsumowanie . . . . .	55
4.3	Wpływ niedopasowania hydrofobowego na dimeryzację inkluzji błonowych .	56
4.3.1	Ujemne niedopasowanie hydrofobowe . . . . .	56
4.3.2	Dodatnie niedopasowanie hydrofobowe . . . . .	58
4.3.3	Uporządkowanie lipidów a dimeryzacja inkluzji wywołana niedopa- sowaniem hydrofobowym . . . . .	61
4.3.4	W jaki sposób lipidy i woda wpływają na dimeryzację inkluzji? . . .	63
4.3.5	W jaki sposób ładunek inkluzji wpływa na ich dimeryzację? . . . .	69
4.3.6	Podsumowanie . . . . .	72

4.4	Niedopasowanie hydrofobowe a segregacja inkluzji między domenami o różnym stopniu uporządkowania . . . . .	73
4.4.1	Energetyka procesu segregacji inkluzji między domenami błonowymi w zależności od niedopasowania hydrofobowego . . . . .	73
4.4.2	Analiza rozkładu cząsteczek rozpuszczalnika i lipidów w otoczeniu inkluzji . . . . .	75
4.4.3	Kiedy inkluzje preferują domeny uporządkowane? . . . . .	77
4.4.4	Segregacja rzeczywistych związków o znaczeniu biologicznym . . . . .	80
4.4.5	Podsumowanie . . . . .	86
4.5	Rola niedopasowania hydrofobowego w wybranych procesach o znaczeniu biologicznym . . . . .	87
4.5.1	Asocjacja rzeczywistych inkluzji . . . . .	88
4.5.2	Wpływ alkoholi na właściwości fizykochemicznych dwuwarstwy lipidowej . . . . .	103
4.5.3	Reorientacja karotenoidów w błonie . . . . .	113
4.5.4	Podsumowanie . . . . .	119
<b>5</b>	<b>Wnioski</b>	<b>122</b>
<b>6</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>127</b>
	<b>Spis rysunków</b>	<b>138</b>
	<b>Spis tabel</b>	<b>142</b>

## Wykaz skrótów

<b>APP</b>	białko prekursorowe amyloidu (ang. amyloid-beta precursor protein)
<b>Asta</b>	astaksantyna
<b>CARC</b>	motyw o odwróconej sekwencji względem CRAC
<b>Chl</b>	cholesterol
<b>CRAC</b>	motyw sekwencyjny rozpoznania/wiązania cholesterolu o ogólnej sekwencji $(K/R) - X_{1-5} - (Y/F/W) - X_{1-5} - (L/V)$
<b>Clc-ec1</b>	białko antyportowe przenoszące aniony chlorkowe i protony
<b>Coul</b>	oddziaływania elektrostatyczne (Coulomba)
<b>DEiPC</b>	dieikozoylofosfatydylocholina (di-20:1 PC)
<b>DEPC</b>	dierukoylofosfatydylocholina (di-22:1 PC)
<b>DMPC</b>	dimirystylofosfatydylocholina (di-14:0 PC)
<b>DOPC</b>	dioleilofostatydylocholina (di-18:1 PC)
<b>DPPC</b>	dipalmitoilofosfatydylocholina (di-16:0 PC)
<b>KALP</b>	rodzina peptydów o ogólnej sekwencji $GKK(LA)_xLKKA$
<b>L11</b>	peptyd opracowany drogą algorytmu genetycznego o sekwencji $D_3K_3L_{11}K_3D_3$
<b>L<sub>D</sub></b>	faza ciekła-nieuporządkowana błony
<b>Lut</b>	luteina
<b>LJ</b>	model oddziaływań dyspersyjnych (Lennarda-Jonesa)
<b>L<sub>O</sub></b>	faza ciekła-uporządkowana błony
<b>LVX</b>	lewofloksacyna
<b>M2</b>	białko otoczki wirusa grypy typu A
<b>MscL</b>	kanal jonowy wrażliwe na bodźce mechaniczne
<b>MD</b>	dynamika molekularna (ang. molecular dynamics)
<b>PBC</b>	periodyczne warunki brzegowe (ang. periodic boundary conditions)
<b>PDB</b>	baza danych zawierająca rozwiązane struktury białek (ang. protein data bank)
<b>POPC</b>	pamitoiloleilofostatydylocholina (16:0-18:1 PC)
<b>RMSD</b>	odchylenie średniokwadratowe z położeń atomów
<b>SDPC</b>	stearoilodokozaheksaenoilofosfatydylocholina (18:0-22:6 PC)
<b>SDPE</b>	stearoilodokozaheksaenoilofosfatydyloetanolamina (18:0-22:6 PE)
<b>SDPS</b>	stearoilodokozaheksaenoilofosfatydyloseryna (18:0-22:6 PS)
<b>SOPC</b>	steraoiloleilofosfatydylocholina (18:0-18:1 PC)
<b>SPME</b>	metoda wyznaczania oddziaływań elektrostatycznych oparta na algorytmie sumowania Ewalda (ang. Smooth particle mesh Ewald)
<b>TatABC</b>	białko translokazowe zawierające motyw bliźniaczej argininy

<b>TIP3P</b>	model wody stosowany w symulacjach
<b>TMD</b>	domena transbłonowa (ang. transmembrane domain)
<b>TP10</b>	amfipatyczny peptyd przenikający przez błonę komórkową (ang. transportan 10)
<b>US</b>	umbrella sampling
<b>VDAC2</b>	białko kanału anionoselektywnego
<b>Vpu</b>	białko U wirusa HIV-1 (ang. Viral Protein U)
<b>WALP</b>	rodzina peptydów o ogólnej sekwencji GWW(LA) <sub>x</sub> LWWA
<b>WHAM</b>	metoda ważonych histogramów (ang. weighted histogram analysis method)
<b>Zea</b>	zeaksantyna

# Wprowadzenie

### 1.1 Błona komórkowa jako płynna mozaika

Błony komórkowe są dwuwymiarowymi, ciekłokrystalicznymi mozaikami lipidów i białek, które oddzielają organella komórki od jej otoczenia [1]. Peptydy i białka obecne w strukturze błon odgrywają kluczową rolę w pełnieniu biologicznych funkcji błon, a ich aktywność może być regulowana przez różne czynniki, takie jak temperatura, pH, potencjał międzybłonowy, modyfikacje potranslacyjne i obecność efektorów allosterycznych [2, 3].

Skład lipidowy błony ma istotny wpływ na funkcjonowanie białek. Istnieje ogromna różnorodność lipidów, które są składnikami błon, co prowadzi do zróżnicowania błon pod względem grubości, krzywizny, modułu zginania, płynności, temperatury przejścia fazowego i stopnia uporządkowania acylowych łańcuchów lipidów [4–6].

W tej części pracy przedstawiam podstawowe informacje na temat wpływu budowy chemicznej lipidów i właściwości fizykochemicznych błony komórkowej na funkcjonowanie białek błonowych. W szczególności skupiam się na niedopasowaniu hydrofobowym i upakowaniu lipidów. Przedstawiam również przykłady układów, w których niedopasowanie hydrofobowe odgrywa istotną rolę w określeniu kierunku spontaniczności procesów.

### 1.2 Rodzaje oraz budowa lipidów

Jednymi z najczęściej występujących lipidów w błonie komórkowej są glicerofosfolipidy, które są pochodnymi glicerolu. Składają się one z hydrofilowej “głowy”, zawierającej grupę fosforanową oraz różne cząsteczki, takie jak cholina, seryna, etanolamina, inozytol lub glicerol, a także hydrofobowego “ogona” z dwoma resztami kwasów tłuszczowych o różnej długości i nasyceniu wiązań [7]. W błonach komórkowych występują również lipidy pochodzące od sfingozyny (sfingomieliny), które pełnią istotne funkcje w przenoszeniu sygnałów i są substratami dla kluczowych metabolitów odpowiedzialnych za wzrost i śmierć komórki [8]. Błony mitochondrialne zawierają natomiast kardiolipiny, które posiadają dwie grupy fosforanowe i cztery łańcuchy acylowe [9].

W błonach komórkowych występują również sterole, które składają się z czterech sprzężonych pierścieni (steranu) i alifatycznego, nasyconego łańcucha bocznego. Różne rodzaje steroli dominują w określonych królestwach lub grupach organizmów. Cholesterol występuje w komórkach zwierzęcych, fitosterole są charakterystyczne dla błon roślinnych, a ergosterol jest dominującym steroidem u grzybów. Organizmy prokariotyczne z kolei nie posiadają steroli w swoich błonach [10, 11].

Błony komórkowe, jako dwuwarstwy lipidowe, zazwyczaj wykazują asymetrię. Badania wskazują, że w siateczce śródplazmatycznej lipidy są rozmieszczone równomiernie między dwoma listkami błony, natomiast asymetryczny rozkład lipidów obserwuje się w aparacie Golgiego, endosomach czy błonach plazmatycznych komórki. W błonach wykazujących asymetrię zewnętrzna warstwa błony składa się głównie z fosfatydylocholin (PC) i sfingomielin (SM), podczas gdy wewnętrzna warstwa zawiera znaczne ilości lipidów zawierających etanolaminę (PE), glicerol (PG) lub serynę (PS) [12, 13]. Również w przypadku steroli obserwowane jest nierównomierne rozłożenie między warstwami błony – większa frakcja cholesterolu znajduje się po zewnętrznej stronie błony, natomiast wysokie stężenia cholesterolu w wewnętrznej warstwie błony obserwuje się w komórkach, które uczestniczą w procesach związanych z przekazywaniem sygnału. Obecność asymetrii nie jest przypadkowa – na przykład ekspozycja PS na zewnętrznej warstwie błony wiąże się z mechanizmem programowanej śmierci komórki [14].

Budowa chemiczna lipidów istotnie wpływa na kształt cząsteczki. Typowy nasycony fosfolipid, który zawiera dwa acylowe łańcuchy, przyjmuje kształt zbliżony do cylindrycznego, podczas gdy sterole bądź kardiolipiny, które zawierają cztery łańcuchy acylowe, mają kształt stożka. Różnice w rozmiarze i ładunku głowy lipidu również prowadzą do pofałdowania błony. Obszary o niezerowej krzywiznie powierzchni mogą być miejscem wiązania niektórych białek [15].

W przeszłości uważano, że główną rolą lipidów jest zapewnienie hydrofobowego środowiska dla funkcjonowania białek. Jednak coraz większą zwraca się na budowę chemiczną łańcuchów acylowych lipidów i ich wpływ na właściwości fizykochemiczne błony. W dalszej części rozprawy przedstawię znaczenie długości łańcuchów i nasycenia wiązań dla dwóch kluczowych właściwości fizykochemicznych błony – grubości i uporządkowania.

### **1.3 Kluczowe właściwości fizykochemiczne błony**

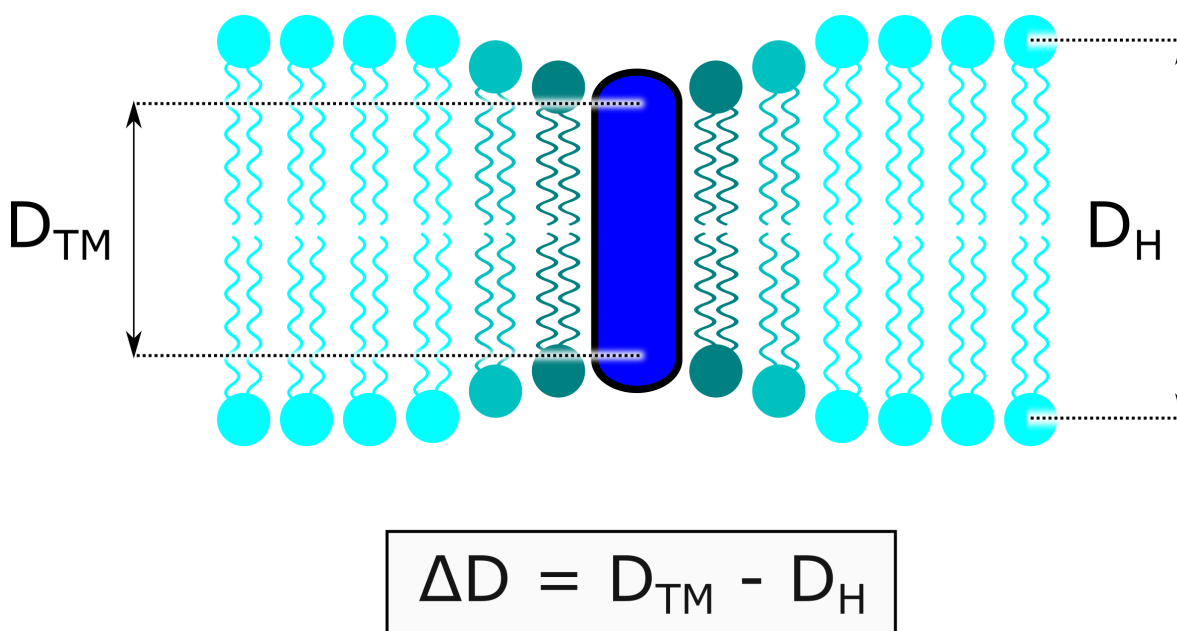
#### **1.3.1 Grubość błony i niedopasowanie hydrofobowe**

Różnice w długości i nasyceniu łańcucha acylowego ogonów lipidów wpływają na jedną z kluczowych właściwości fizykochemicznych błony, jaką jest grubość rdzenia hydrofobowego ( $D_H$ ). Obecność steroli również wpływa na grubość błony poprzez wypełnianie przestrzeni między lipidami i rozciąganie łańcuchów acylowych lipidów.

Niedopasowanie hydrofobowe ( $\Delta D$ ) występuje, gdy hydrofobowa długość białka błonowego lub innej inkluzji ( $D_{TM}$ ) różni się od hydrofobowej grubości dwuwarstwy lipidowej ( $D_H$ ) [16]. Schemat i definicję niedopasowania hydrofobowego przedstawiłem na Rys. 1.1.







Rys. 1.1: Definicja niedopasowania hydrofobowego jako różnica między długością hydrofobowego fragmentu cząsteczki, a grubością rdzenia hydrofobowego błony.

Dodatnie niedopasowanie hydrofobowe ( $\Delta D > 0$ ) oznacza, że w przypadku braku odpowiedzi błony, hydrofobowe (niepolarnie) fragmenty inkluzji byłyby eksponowane na polarny rozpuszczalnik. Natomiast ujemne niedopasowanie hydrofobowe ( $\Delta D < 0$ ) oznaczałoby, że w przypadku braku odpowiedzi błony, hydrofobowe fragmenty lipidów byłyby eksponowane na wodę lub polarne fragmenty inkluzji. W rzeczywistości układ dąży do minimalizacji tego niekorzystnego termodynamicznie efektu poprzez zmiany konformacyjne inkluzji lub lipidów (czego następstwem może być lokalnie ścienienie błony, jak na Rys. 1.1). Ponadto można zaobserwować zmiany orientacji, asocjacje lub transfer inkluzji do obszaru błony o grubości odpowiadającej  $\Delta D \approx 0$  [16].

### 1.3.2 Upakowanie lipidów

Inna kluczowa właściwość, jaką jest upakowanie lipidów, zależy głównie od stosunku między nasyconymi a nienasyconymi łańcuchami acylowymi w błonie. Nasycone łańcuchy acylowe mogą być gęsto upakowane, co prowadzi do niskiej płynności błony i wysokiej temperatury przejścia fazowego ( $T_m$ ) z fazy żelowej do ciekłej. Z kolei, nienasycone łańcuchy acylowe oddziałują ze sobą słabiej, ze względu na mniejszą powierzchnię kontaktu, co zwiększa płynność błony i obniża temperaturę przejścia fazowego.

Obecność steroli wpływa również na upakowanie błony poprzez wypełnianie przestrzeni między łańcuchami acylowymi lipidów, co prowadzi do zwiększonego uporządkowania tych łańcuchów. Sterole chętniej oddziałują z lipidami nasyconymi, zwłaszcza sfingomieliną, ze względu na możliwość utworzenia większej ilości oddziaływań międzycząsteczkowych niż w przypadku lipidów nienasyconych. Ponadto, obecność steroli między

lipidami utrudnia agregację lipidów, co przyczynia się do obniżenia temperatury przejścia fazowego ( $T_m$ ) błony [17, 18].

W modelowych błonach, które zawierają jednocześnie lipidy nasycone, lipidy nienasycone i sterole, obserwuje się powstawanie niemieszających się ze sobą domen o różnej płynności i grubości. Pierwsza z tych domen, zwana domeną uporządkowaną ( $L_O$ ), skupia głównie lipidy nasycone i sterole, co powoduje jej większą grubość i niższą płynność. Druga domena, zwana domeną nieuporządkowaną ( $L_D$ ), zawiera przede wszystkim lipidy nienasycone, co sprawia, że jest cieńsza i bardziej płynna.

Podobne domeny o różnym stopniu uporządkowania obserwuje się również w błonach biologicznych. Często określa się je jako tratwy lipidowe lub rafty lipidowe i są preferowanymi miejscami przebywania wielu białek odpowiedzialnych za przekazywanie sygnałów lub transfer (poprzez endocytozę lub egzocytozę) [19–21]. Jednak termin “tratwy lipidowe” jest kontrowersyjny, ponieważ te domeny są dynamiczne, a obszary, na których się znajdują, są bardzo małe [22].

Należy zauważyć, że zmiany w upakowaniu lipidów są ściśle powiązane ze zmianami w grubości błony, dlatego trudno jest oddzielić efekt niedopasowania hydrofobowego od upakowania lipidów i *vice versa*.

## 1.4 Sposoby odpowiedzi układu na niedopasowanie hydrofobowe

### 1.4.1 Lokalna zmiana grubości błony

Jednym ze sposobów minimalizacji niedopasowania hydrofobowego jest dostosowanie efektywnej długości lipidów sąsiadujących z inkluzją, co prowadzi do lokalnego pogrubienia lub ścienienia błony. Dla obszarów o zmienionej grubości spowodowanej obecnością inkluzji można określić wielkość zaburzenia, wykorzystując do tego celu obwód zaburzenia  $p$ .

### 1.4.2 Asocjacja

Innym sposobem minimalizacji niedopasowania hydrofobowego jest asocjacja dwóch lub więcej inkluzji. W literaturze przedstawiono różne motywy asocjacyjne, takie jak sekwencje GxxxG czy tzw. motyw z zamkiem leucynowym, które stabilizują asocjaty poprzez korzystne oddziaływania międzycząsteczkowe [23–26]. Jednak badania wykazują, że mutacje kluczowych reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za asocjację peptydów jedynie osłabiają, a nie całkowicie zatrzymują zdolność do dimeryzacji [27]. To sugeruje, że asocjacja białek jest bardziej złożonym procesem, który zależy od różnych czynników, w tym od niedopasowania hydrofobowego.

Przykładem, potwierdzającym znaczący wpływ niedopasowania hydrofobowego na asocjację związków, jest kompleks TatABC, który jest zaangażowany w transport białek przez błonę [28, 29]. Kompleks ten składa się z “rdzenia” zawierającego podjednostki C i B, oraz “kanału”, który jest agregatem kilkunastu podjednostek A. Dotychczasowe badania

wykazały, że część hydrofobowa podjednostki A musi być krótsza od grubości błony, aby umożliwić stabilne połączenie rdzenia BC z kanałem [30]. Ponadto, zwiększenie długości monomeru A poprzez utworzenie chimerycznych form peptydu prowadzi do zmniejszenia aktywności kompleksu.

Przeprowadzono także eksperymenty na błonowym peptydzie Vpu, który jest kodowany przez wirusa HIV-1 [31]. Niedopasowanie hydrofobowe wpływa istotnie nie tylko na dimeryzację Vpu, ale także na jego zdolność do wiązania się z innymi peptydami obecnymi w błonie zainfekowanej komórki. Badania sugerują również, że Vpu może głównie oligomeryzować w obrębie aparatu Golgiego, którego błony są grubsze niż błony siateczki śródplazmatycznej [32, 33]. Asocjacja wywołana przez niedopasowanie hydrofobowe jest szczególnie obserwowana w przypadku większych białek, takich jak rodopsyna [34], anionowy kanał VDAC2 [35], transporter ClC-ec1 [36], a także transbłonowa domena białka M2, który należy do wirusa grypy typu A [37, 38].

#### 1.4.3 Zmiana konformacyjna i reorientacja białka

Kolejnym rodzajem odpowiedzi na niedopasowanie hydrofobowe jest zmiana konformacyjna lub reorientacja białka. Przykładem białka, dla którego zaobserwowano taki mechanizm jest MscL, czyli występujący w komórkach prokariotycznych kanał jonowy aktywowany naprężeniem mechanicznym błony. Badania pokazują, że grubość błony ma istotny wpływ na jego konformację, które z kolei przekłada się na otwieranie i zamykanie kanału [39]. Zmiana orientacji helisy może również wpływać na powierzchnię kontaktu w obrębie domeny wiążącej i zwiększać tendencję do asocjacji peptydów [27, 40].

#### 1.4.4 Transfer pomiędzy domenami błony

W przypadku, gdy błona zawiera zarówno lipidy nasycone i nienasycone, a także sterole, tworzą się w błonach domeny uporządkowane ( $L_O$ ) i nieuporządkowane ( $L_D$ ), które różnią się grubością, co umożliwia transfer białek do obszarów o wartości  $\Delta D$  bliższej zera. Proces ten został zaproponowany jako kluczowy dla transferu białek pomiędzy aparatem Golgiego a siateczką śródplazmatyczną [41]. Istotnie, chociaż transfer pomiędzy organellami jest związany z peptydami sygnałowymi i białkami transportowymi, to jednak na transfer białka może wpływać długość hydrofobowa cząsteczki. Ponadto, transfer do domeny o mniejszym  $|\Delta D|$  może zapewnić prawidłową aktywność biologiczną, co zostało zaobserwowane w przypadku perfringolizyny O [42].

Należy jednak zauważyć, że proces transferu i asocjacji białek jest bardziej złożony, a wiele czynników może wpływać na preferencje lokalizacyjne białek w błonie. Nie zawsze obserwuje się tendencję do asocjacji białek z obszarami o mniejszym niedopasowaniu hydrofobowym, ponieważ w większości przypadków białka preferują przede wszystkim wiązanie się do domeny  $L_D$  [43–46]. Z drugiej strony, istnieją także białka (np. receptory sprzężone z białkami G, GPCR), które preferują lokalizację w domenach zawierających

cholesterol ( $L_0$ ) ze względu na obecność motywów, takich jak CRAC czy CARC, wykazujących powinowactwo względem steroli [47, 48]. Ponadto, białka błonowe mają często zdolność do lokalnego modyfikowania składu lipidowego, rekrutując do swojego bezpośredniego otoczenia lub zubożając je o konkretne rodzaje lipidów [49].

## **1.5 Molekularna charakterystyka niedopasowania hydrofobowego oraz dotychczasowe sposoby jej analizy**

Ze względu na różnorodność sposobów minimalizacji kosztu energetycznego wynikającego z niedopasowania hydrofobowego, zazwyczaj trudno przewidzieć, w jaki sposób konkretne białko będzie reagować na ten efekt. Ponadto, molekularne mechanizmy niedopasowania hydrofobowego nadal są słabo poznane i istnieje wiele pytań, na które odpowiedzi mogą dostarczyć cenne informacje na temat funkcjonowania ważnych białek błonowych. W tym podrozdziale przedstawię dotychczasowy stan wiedzy na temat charakterystyki niedopasowania hydrofobowego oraz narzędzi, które umożliwiły lepsze jego opisanie.

### **1.5.1 Proste peptydy modelowe**

Jednym ze sposobów uproszczenia badanego zagadnienia jest wykorzystanie modelowych peptydów, takich jak WALP i KALP posiadających sekwencje odpowiednio  $GWW(LA)_xLWWA$  i  $GKK(LA)_xLKKA$  (gdzie  $x$  oznacza liczbę powtórzeń aminokwasów L oraz A). Peptydy te są interesujące, ponieważ, pomimo braku motywów asocjacyjnych, chętnie dimeryzują, co zostało zaobserwowane w badaniach z wykorzystaniem znakowanych pirenem peptydów WALP, w których mierzono wydajność FRET [50]. Symulacje komputerowe również potwierdzają skłonność peptydów WALP do dimeryzacji [51]. Nawet w przypadku tak prostych peptydów, specyficzne oddziaływania odgrywają istotną rolę w procesie dimeryzacji, co prowadzi do obserwowanej preferencji tworzenia dimerów o ułożeniu antyrównoległym. Ponadto, dotychczasowe symulacje komputerowe badające oddziaływania między dimerami WALP i KALP opierały się głównie na modelach gruboziarnistych (ang. coarse-grained), które dostarczają stosunkowo wiarygodnych oszacowań energii swobodnej wiązania, jednak często niewłaściwie uwzględniają wkłady entropowe i entalpowe.

### **1.5.2 Rola aminokwasów kotwiczących do błony**

Cząsteczki znajdujące się w błonie lipidowej zazwyczaj posiadają polarne fragmenty, które pełnią rolę kotwiczącą do jednego lub obu listków błony. Dodatkowo, aminokwasy “kotwiczące” umożliwiają utrzymanie stałego nachylenia helisy w błonie [52]. Wśród najczęściej spotykanych aminokwasów kotwiczących można wymienić te, które zawierają aromatyczne łańcuchy boczne, takie jak tryptofan, tyrozyna lub fenyloalanina, oraz te o ładunku dodatnim, takie jak lizyna bądź arginina.

Warto jednak zauważyć, że wspomniane aminokwasy kotwiczą do błony w różny sposób. Wykazano [53], że tryptofan poprzez swój pierścień indolowy tworzy wiązania

wodorowe z grupą karbonylową, podczas gdy dodatkowo naładowana lizyna preferuje oddziaływania z położonymi bliżej fazy wodnej grupami fosforanowymi. W rezultacie, peptydy o tej samej długości, ale z różnymi aminokwasami kotwiczącymi, mogą mieć różny wpływ na temperaturę przejścia fazowego, co zostało zademonstrowane na przykładzie peptydów KALP i WALP [54]. Możemy więc stwierdzić, że helikalne peptydy o takiej samej długości ale z różnymi resztami kotwiczącymi, mogą mieć wyraźnie różną długość hydrofobową  $D_{TM}$ . W konsekwencji te peptydy przechylają się w błonie pod innym kątem, aby zminimalizować koszt energetyczny związany z niedopasowaniem hydrofobowym [52].

### 1.5.3 Napięcie liniowe

Innych cennych wskazówek dotyczące asocjacji i transferu białek między domenami błony o różnej grubości dostarcza praca D. Milovanovica, która skupia się na transbłonowym fragmencie syntaksyny. W pracy tej zbadano, jak niedopasowanie hydrofobowe wpływa na stabilność dimerów syntaksyny oraz powiązano wyniki z teorią o “napięciu liniowym” [55].

Umieszczenie inkluzji w błonie wiąże się z pewnym kosztem energetycznym  $\Delta G$ , w którym zawarte jest utworzenie wiązań inkluzja-błona czy zmiana lokalnej grubości błony. Natomiast terminem “napięcia liniowego”  $\sigma$  określamy pracę związaną z włożeniem inkluzji do błony w przeliczeniu na jednostkę obwodu zaburzenia  $p$ , co można zapisać wzorem:  $\sigma = \Delta G/p$  [56–58].

Procesy związane z napięciem liniowym obejmują tworzenie domen błonowych o różnym stopniu uporządkowania. Wykazano, że wielkość tych domen jest ściśle zależna od różnicy długości łańcuchów acylowych lipidów reprezentujących poszczególne domeny, co wpływa na napięcie liniowe [59]. Oznacza to również, że można powiązać  $\sigma$  z niedopasowaniem hydrofobowym  $\Delta D$ .

W czasie dimeryzacji dwóch inkluzji, dochodzi do równoczesnej koalescencji dwóch obszarów zaburzenia. Oznacza to, że sumaryczny obwód zaburzenia maleje, a jego różnica  $\Delta p$  przemnożona przez  $\sigma$  pozwala oszacować zmianę energii swobodnej wynikającej z dimeryzacji inkluzji. Według tej teorii można tłumaczyć, dlaczego błonowe peptydy rekrutują inne peptydy lub lipidy o takiej samej wielkości [60].

## 1.6 Wybrane przykłady procesów napędzanych przez niedopasowanie hydrofobowe

W dalszej części przedstawię przykłady procesów o znaczeniu biologicznym, w których kluczową rolę odgrywa niedopasowanie hydrofobowe. Procesy te angażują zarówno białka oraz peptydy, jak i inne cząsteczki osadzone w błonach lipidowych, takie jak alkohole oraz karotenoidy.

### 1.6.1 Wiązanie się cholesterolu do peptydów L11 i KALP21

Funkcjonowanie wielu białek zależy od obecności steroli w błonie, w której białko jest zakotwiczone. Jednym z motywów, które wydają się zwiększać powinowactwo białek

do cholesterolu, jest motyw CRAC (ang. cholesterol recognition/interaction amino acid consensus) [48, 61, 62]. Konsensusowa sekwencja motywu CRAC ma postać (L/V)–X<sub>1-5</sub>–(Y/F/W)–X<sub>1-5</sub>–(K/R), gdzie symbol X oznacza dowolny aminokwas. Warto zauważyć, że ten motyw jest na tyle elastyczny (ponad 10<sup>13</sup> kombinacji), że może służyć nie tylko do specyficznego wiązania cholesterolu. Z drugiej strony motyw wskazuje kluczowe reszty aminokwasowe, które wpływają na otoczenie lipidowe i pośrednio indukują wiązanie cholesterolu. Liczne badania potwierdzają zwiększone powinowactwo cholesterolu do białek zawierających “gładką” powierzchnię molekularną zapewnianą przez obecność reszt leucyny lub waliny [63].

Zadając pytanie “Jaka sekwencja aminokwasowa peptydu zapewnia najlepsze powinowactwo cholesterolu do niego?”, należy zauważyć, że badanie wszystkich możliwych struktur może być niemożliwe, zwłaszcza gdy weźmiemy pod uwagę peptydy o długości około 20 reszt aminokwasowych, co daje liczbę kombinacji wynoszącą 20<sup>20</sup>. Aby rozwiązać ten problem, zespół profesora H.J. Risselady zastosował tzw. algorytm genetyczny [64].

Algorytmy genetyczne modelują mechanizmy darwinistycznej ewolucji w ramach algorytmu obliczeniowego. Wykorzystują takie elementy jak rekombinacja, krzyżowanie, mutacja, selekcja i ocena przystosowania. W przypadku algorytmów genetycznych, pojęcie “przystosowania” odnosi się do wskaźnika jakości, który informuje o tym, jak dobrze dana cząsteczka odpowiada na zdefiniowane warunki. Związki o najwyższym przystosowaniu mają większe szanse na przekazanie swojej struktury do następnej generacji, podczas gdy cząsteczki o niższym przystosowaniu mają mniejsze szanse na przetrwanie lub przyczynienie się do rozwoju populacji. W przypadku tego badania, funkcją przystosowania jest suma energii oddziaływań między peptydem a wszystkimi cząsteczkami cholesterolu znajdującymi się w zdefiniowanym promieniu odcięcia. W rezultacie, peptyd o najlepszej sekwencji będzie zawierał największą liczbę cząsteczek cholesterolu w swoim otoczeniu.

Zaproponowana przez zespół Profesora H.J. Risselady metoda (TU Dortmund), nazwana Evo-MD, opiera się na wykorzystaniu symulacji gruboziarnistej dynamiki molekularnej w celu określenia funkcji przystosowania. Aby uprościć proces, algorytm przekształca tylko jedną połowę aminokwasów helisy, podczas gdy druga połowa struktury jest jej lustrzanym odbiciem. Następnie algorytm wybiera zbiór peptydów o najlepszym dopasowaniu, czyli takich, w których energia oddziaływań między peptydem a cholesterolami będzie największa. Na podstawie wyników uzyskanych przy pomocy tej metody możliwe jest określenie zakonserwowania reszt aminokwasowych na poszczególnych pozycjach.

Badania przeprowadzone za pomocą Evo-MD pozwoliły ustalić, że transbłonowa helisa o najwyższym powinowactwie do cholesterolu zawiera reszty polarnych aminokwasów w pozycjach 1–6 (lizyna oraz kwasy asparaginowy i glutaminowy), zaś w pozycjach 7–10 występują reszty niepolarnych aminokwasów, zwłaszcza proliny, waliny i izoleucyny. Ponadto wysokie powinowactwo do cholesterolu obserwuje się również dla peptydów o podobnej sekwencji, zawierających polarną resztę lizyny w pozycji 7. To sugeruje, że struktury



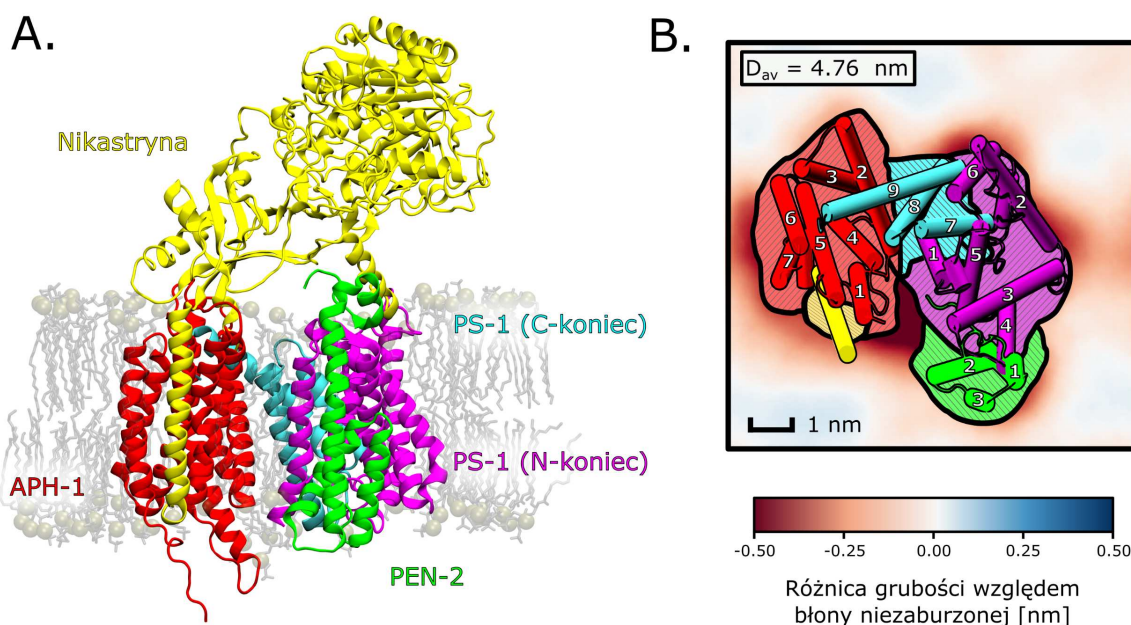
o krótszych blokach hydrofobowych mogą również wykazywać wysokie powinowactwo do cholesterolu. Wydaje się nieoczekiwane, że prolina i walina są tak silnie zakonserwowane na pozycjach 7-10 [65, 66], jednak należy pamiętać, że jest to wynik wcześniej przyjętego założenia, że wszystkie peptydy utrzymują strukturę  $\alpha$ -helisy. Ponadto, modele gruboziarniste szacują energie oddziaływań międzycząsteczkowych w sposób mniej realistyczny niż modele pełnoatomowe, dlatego do dalszych badań wykorzystano peptyd zawierający reszty leucyny w bloku hydrofobowym.

Zaproponowana struktura L11 o sekwencji  $D_3K_3L_{11}K_3D_3$  nie zawiera reszt aminokwasowych o aromatycznych łańcuchach bocznych, które są istotne dla struktur zawierających motyw CRAC. Niemniej jednak, L11 stanowi interesujący przykład, który pokazuje, że uniwersalna cecha peptydu, jaką jest rozmiar bloku hydrofobowego, może być wystarczająca do osiągnięcia zwiększonego powinowactwa do cholesterolu. W celu potwierdzenia wyników uzyskanych przy użyciu metody Evo-MD, przeprowadzono zarówno eksperymentalne badania nad tym peptydem, jak i pełnoatomowe symulacje dynamiki molekularnej, które wykonałem osobiście. Oczekiwany rezultat było istotne wpływanie niedopasowania hydrofobowego na wiązanie cholesterolu do peptydu.

#### 1.6.2 Wiązanie się białka prekursorowego amyloidu do $\gamma$ -sekreazy

$\gamma$ -sekreaza (Rys. 1.2) jest proteazą błonową, która odgrywa rolę w regulowanej proteolizie wewnątrzłonowej [67]. Jej funkcją jest rozszczepianie wielu peptydów i białek sygnalizacyjnych w obrębie ich domeny transłonowej (TMD). Jednym z najbardziej znanych substratów  $\gamma$ -sekreazy jest białko prekursorowe amyloidu (APP), które jest związane z rozwojem choroby Alzheimera. Niewłaściwe cięcie APP powoduje nadmierną produkcję polipeptydów  $\beta$ -amyloidu, które asocjują w rozpuszczalne oligomery i fibrylarne agregaty, prowadząc do upośledzenia aktywności synaptycznej i obumierania neuronów [68, 69].

Zidentyfikowano ponad 90 znacząco różniących się substratów  $\gamma$ -sekreazy [70, 71]. W związku z tym sugeruje się, że wiązanie substratów do  $\gamma$ -sekreazy odbywa się poprzez uniwersalny mechanizm, a nie specyficzne motywy asocjacyjne. Wykazano, że aktywność proteolityczna  $\gamma$ -sekreazy zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia cholesterolu w błonie lipidowej [72–74]. Usunięcie cholesterolu z błony powoduje niemal całkowite zahamowanie aktywności proteolitycznej tej proteazy [75]. Prowadzi to do pytania dotyczącego roli cholesterolu w tym procesie: czy jest on bezpośrednio związany z jednym z białek (enzymem lub substratem), czy też pośrednio, poprzez modyfikację właściwości fizykochemicznych błony, wpływa na asocjację substratu z  $\gamma$ -sekreazą?



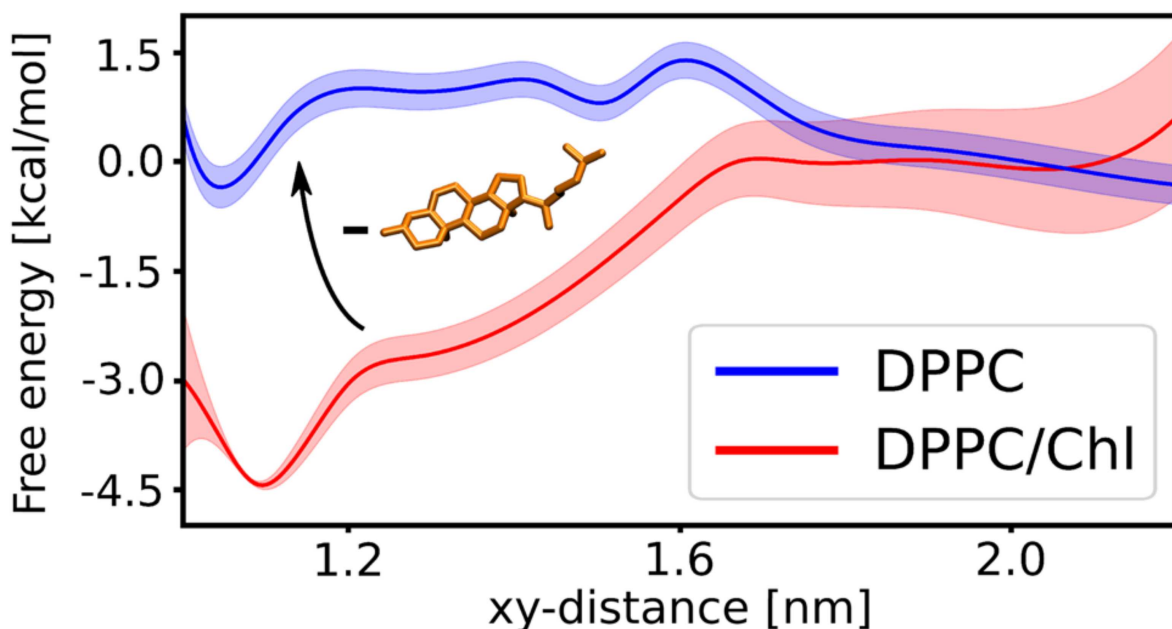
**Rys. 1.2:** Struktura  $\gamma$ -sekreazy w błonie. (A) Widok z boku wraz z podpisem wszystkich kluczowych podjednostek. (B) Mapa lokalnej grubości błony DPPC/Chl w otoczeniu  $\gamma$ -sekreazy. Cylindrami przedstawiono poszczególne helisy transbłonowe białka.

W ramach swojej rozprawy doktorskiej, doktor Łukasz Nierzwicki przeprowadził badania mające na celu zbadanie roli cholesterolu w procesie wiązania substratu APP z  $\gamma$ -sekreazą. W przypadku błony zawierającej DPPC oraz cholesterol (o stężeniu 40% mol), uzyskał on profil energii swobodnej (Rys. 1.3, czerwony), który prezentuje szerokie i głębokie minimum o głębokości 4.5 kcal/mol. To wskazuje na relatywnie wysokie powinowactwo substratu do  $\gamma$ -sekreazy.

W przypadku całkowitego braku cholesterolu w błonie, zaobserwowano zmniejszenie głębokości studni energii swobodnej, co przełożyło się na spadek powinowactwa do wartości rzędu 0.5 kcal/mol (Rys. 1.3, niebieski). Zaproponowano zatem, że dodatek cholesterolu do błony DPPC zwiększa grubość błony, co skutkuje ujemnym niedopasowaniem hydrofobowym między APP lub  $\gamma$ -sekreazą, a grubością błony. W rezultacie układ dążył do minimalizacji efektu niedopasowania hydrofobowego poprzez wiązanie APP z  $\gamma$ -sekreazą.

Dodatkowo, gdy  $\gamma$ -sekreaza oraz APP znajdowały się w błonie SOPC (18:0-18:1 PC), zaobserwowano, że sztuczne zwiększenie grubości błony do poziomu odpowiadającego DPPC/Chl (poprzez przyłożenie dodatkowego potencjału) podobnie sprzyjało wiązaniu substratu z enzymem [76]. To pokazuje, że na zwiększone powinowactwo APP do  $\gamma$ -sekreazy wpływa przede wszystkim grubość błony, niż specyficzne oddziaływania białko-cholesterol. W ramach mojej pracy przeprowadziłem analizę symulacji przeprowadzonych przez dra Nierzwickiego, celem potwierdzenia wpływu niedopasowania hydrofobowego na wiązanie APP z  $\gamma$ -sekreazą. W części wynikowej przedstawię również, w jaki sposób teoria napięcia liniowego wyjaśnia zmiany energii swobodnej towarzyszące procesowi wiązania APP do  $\gamma$ -sekreazy.





Rys. 1.3: Profile energii swobodnej dla wiązania substratu przez  $\gamma$ -sekretagę w obecności (czerwony) lub nieobecności (niebieski) cholesterolu w błonie DPPC. Wyniki obliczeń opublikowano w [76].

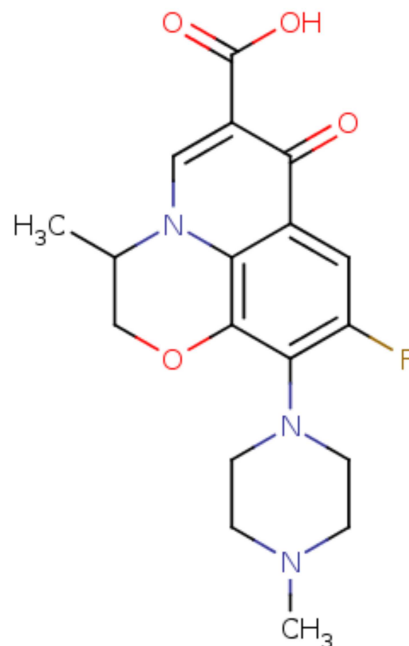
### 1.6.3 Agregacja koniugatów peptyd-antybiotyk w obrębie błon lipidowych

Ostra białaczka szpikowa (ang. acute myeloid leukemia) stanowi jedną z najczęstszych postaci białaczki [77]. Przyczyna tej choroby nadal pozostaje otwartą kwestią. Obecnie wskazuje się trzy czynniki, które mogą być związane z jej wystąpieniem: promieniowanie jonizujące, benzen oraz środki alkilujące [78]. Główną metodą leczenia ostrej białaczki szpikowej jest chemioterapia. W obszarze innowacyjnych metod leczenia znajdują się także peptydy transbłonowe o działaniu selektywnym, które wykazują większą aktywność wobec komórek nowotworowych niż zdrowych komórek. Ich mechanizm działania polega na zaburzaniu ciągłości błony komórkowej, co prowadzi ostatecznie do śmierci komórki. Przykładem takiego związku jest peptyd transportan 10 (TP10).

Jednym z efektów ubocznych stosowania chemioterapii jest zwiększone ryzyko wystąpienia chorób zakaźnych, zwłaszcza infekcji bakteryjnych [79]. Z tego powodu, podczas chemioterapii jednocześnie stosuje się antybiotyki z grupy fluorochinolonów, takich jak lewofloksacyna (LVX, Rys. 1.4) lub cyprofloksacyna [80–82]. Fluorochinolony działają poprzez hamowanie gyrazy bakteryjnej i topoizomerazy IV [83, 84]. W wysokich stężeniach fluorochinolony mają zdolność do hamowania proliferacji i wywoływania starzenia się komórek rakowych poprzez indukcję dysfunkcji mitochondriów [85].

Pomimo stosowania chemioterapii połączonej z zastosowaniem antybiotyków, umieralność związana z wystąpieniem ostrej białaczki szpikowej nadal pozostaje na poziomie 20–40% [86]. Jednym z efektów ubocznych zastosowania fluorochinolonów w terapii jest indukowanie stresu oksydacyjnego, co prowadzi do uszkodzeń struktury DNA, białek oraz utlenienia lipidów błonowych [87–89].

Z tego powodu badane są nowe metody leczenia, które mogłyby zapewnić skuteczniejszą terapię, minimalizując jednocześnie ryzyko dla zdrowia pacjenta. Jedną z proponowanych możliwości leczenia białaczki opiera się na wykorzystaniu koniugatów, które zawierają w swojej budowie jednocześnie antybiotyk LVX, jak i związek o właściwościach cytotoksycznych – transportan 10 (TP10). Badania sugerują, że koniugaty wykorzystujące peptyd TP10 powodują istotny wzrost porowatości błony przy stosowaniu wysokich stężeń TP10 [90]. Dodatkowo, zaobserwowano, że tego rodzaju koniugaty charakteryzują się niższym ryzykiem wywołania stresu oksydacyjnego [91, 92].



Rys. 1.4: struktura chemiczna lewofloksacyny (LVX).

Badania prowadzone pod kierownictwem Profesora Krzysztofa Rolki z Uniwersytetu Gdańskiego wykazały, że koniugaty TP10–NH<sub>2</sub>–LVX wykazują wysoką selektywność wobec komórek białaczki w porównaniu do komórek zdrowych [93]. Dodatkowo, wykazują one silną aktywność przeciwdrobnoustrojową [94]. W celu dalszego rozwoju potencjalnych chemioterapeutyków kluczowe było zrozumienie mechanizmu cytotoksyczności koniugatu TP10–NH<sub>2</sub>–LVX i jego potencjalnego działania przeciwnowotworowego. Badanie tego mechanizmu mogłoby przyczynić się do dalszych postępów w tej dziedzinie leków. W części wynikowej zaprezentuję dowody na istotną rolę oligomeryzacji koniugatów w procesie permeabilizacji błony. Dodatkowo, przedstawię argumenty potwierdzające kluczowe znaczenie niedopasowania hydrofobowego w tworzeniu porów wodnych. Dodatkowo, zaprezentuję wyniki wskazujące na niezależność agregacji koniugatów TP10–NH<sub>2</sub>–LVX od składu lipidowego błony.

#### 1.6.4 Wpływ długości hydrofobowej alkoholi na właściwości fizykochemiczne błony

Alkohole, ze względu na swoją strukturę chemiczną, mają zdolność do wiązania się z błonami lipidowymi, co może prowadzić do modyfikacji ich właściwości fizykochemicznych. Dlatego też alkohole są dobrze znane ze swoich właściwości anestetycznych [95, 96]. Zgodnie z prawem Meyera-Overtona, efektywność cząsteczki jako anestetyka wzrasta wraz z jej hydrofobowością, co w przypadku alkoholi jest powiązane z długością łańcucha węglowodorowego [97, 98]. Jednak po przekroczeniu pewnej długości hydrofobowej, występuje całkowite zanikanie właściwości anestetycznych (ang. anesthetic “cut-

off”). W przypadku alkoholi, całkowite zanikanie występuje dla łańcuchów zawierających więcej niż 13 atomów węgla [99].

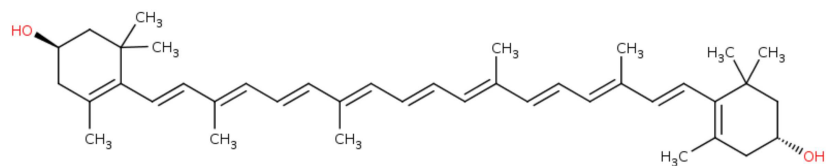
Grupa Profesora V.A. Raghunathana (Raman Research Institute, Indie) postawiła sobie za cel zbadanie wpływu alkoholi o różnej długości łańcucha na właściwości fizykochemiczne błon lipidowych. Dotychczas przeprowadzone badania pozwoliły zauważyć, że wpływ alkoholi na te właściwości różni się w zależności od długości łańcucha alkilowego alkoholu. Dodatek krótszych alkoholi (włącznie do oktanolu) prowadzi do obniżenia temperatury przejścia fazowego ( $T_m$ ) oraz zmniejszenia grubości dwuwarstwy lipidowej w porównaniu do błony zawierającej tylko DMPC (di-14:0 PC). Z kolei dodatek dłuższych alkoholi (dekanolu, dodekanolu) powoduje zwiększenie  $T_m$ , przy niewielkiej różnicy w grubości błony w porównaniu do czystego DMPC. Do tej pory nieznanym był molekularny mechanizm, który wyjaśniłby zróżnicowane odpowiedzi błony na dodatek alkoholi o różnych długościach łańcucha. W części wynikowej udowodnię, że kluczowym czynnikiem wpływającym na odpowiedź błony jest niedopasowanie hydrofobowe pomiędzy cząsteczkami alkoholi i lipidów, bazując na przeprowadzonych przeze mnie obliczeniach.

#### 1.6.5 Karotenoidy i ich rola w ochronie oka przed fotouszkodzeniami

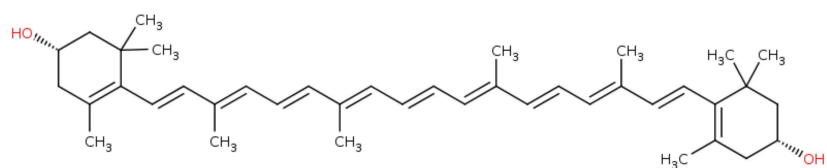
Karotenoidy, takie jak luteina, zeaksantyna i mezo-zeaksantyna (Rys. 1.5), są obecne w wysokich stężeniach w błonach siatkówki oka [100, 101]. Szczególnie wiele karotenoidów znajduje się w plamce żółtej, bogatym w czopki regionie odpowiedzialnym za widzenie centralne o wysokiej ostrości [102]. Badania naukowe wielokrotnie wskazywały na wpływ karotenoidów na prawidłowe funkcjonowanie oka, w tym ich właściwości przeciwutleniające [103–105].

Rola karotenoidów w ochronie fotoreceptorów oka była dotąd mało poznana. Dlatego zespół pod kierownictwem profesora W.I. Gruszeckiego (UMCS W Lublinie) przeprowadził badania, wykorzystując błony siatkówki oka oraz liposomy zawierające karotenoidy. Na podstawie badań spektroskopowych i mikroskopowych wysunięto hipotezę, zgodnie z którą działanie intensywnego światła powoduje reorientację cząsteczek karotenoidów. Proces ten ma na celu efektywne absorbowanie fotonów padających na siatkówkę, co prowadzi do zmniejszenia przenikania światła do kolejnych warstw siatkówki zawierających fotoreceptory. Dodatkowo zasugerowano, że zmiana orientacji cząsteczek wiąże się z izomeryzacją geometryczną (cis-trans) [106].

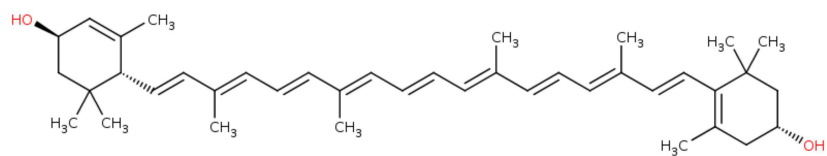
Ta hipoteza skłoniła do dalszych badań nad orientacją izomerów karotenoidów przy użyciu metod komputerowych, które podjąłem. W części wynikowej pokażę, że niedopasowanie hydrofobowe między karotenoidem a błoną wynika z przekształcenia karotenoidów w formę izomeru cis. W rezultacie izomer cis reaguje na niedopasowanie hydrofobowe, zmieniając swoją orientację w błonie. Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają hipotezę, że karotenoidy mogą pełnić rolę rodzaju “molekularnych żaluzji” w oku.



zeaksantyna (Zea)



mezo-zeaksantyna



luteina

Rys. 1.5: Struktury chemiczne trzech karotenoidów obecnych w siatkówce oka.

### Cele oraz zakres pracy

Niedopasowanie hydrofobowe istotnie wpływa na asocjację inkluzji błonowych, ich segregację pomiędzy domenami o różnym stopniu uporządkowania konformacyjnego lipidów oraz preferowaną orientację w błonie. Głównym celem mojej rozprawy doktorskiej było ilościowe zbadanie roli niedopasowania hydrofobowego jako powszechnie występującej siły napędowej procesów zachodzących w obrębie błon lipidowych. W szczególności zadałem sobie pytanie o konkretne mechanizmy i oddziaływania międzycząsteczkowe leżące u podstaw kluczowej roli niedopasowania hydrofobowego w wyżej wymienionych procesach.

Większość dotychczasowych badań nad niedopasowaniem hydrofobowym skoncentrowana była na inkluzjach o określonej strukturze chemicznej, a zatem wykazujących specyficzne oddziaływania inkluzja-błona. Obecność takich oddziaływań znacząco komplikuje analizę roli samego niedopasowania hydrofobowego w badanych procesach, takich jak asocjacja czy segregacja między domenami błonowymi. Ponadto, w przypadku naturalnych inkluzji, takich jak peptydy błonowe, ich zmienność konformacyjna uniemożliwia ścisłą kontrolę stopnia niedopasowania hydrofobowego, co dodatkowo utrudnia badania.

W związku z tym, aby osiągnąć postawiony w pracy cel, opracowałem minimalny model inkluzji błonowej, który nie wykazywałby specyficznych oddziaływań z lipidami, umożliwiając tym samym bezpośrednie badanie roli niedopasowania hydrofobowego w wyżej wymienionych procesach. Co istotne, opracowany model umożliwia precyzyjną kontrolę kluczowych parametrów inkluzji, takich jak długość, średnica, czy ładunek elektryczny.

Opracowany model inkluzji wykorzystałem następnie do przeprowadzenia molekularnej charakterystyki niedopasowania hydrofobowego i jego roli w poszczególnych procesach błonowych. To nadrzędne zadanie badawcze podzieliłem na cztery poniższe zadania szczegółowe.

#### **1. Zbadanie energetyki procesu tworzenia ujemnego niedopasowania hydrofobowego.**

Lokalne ścinienie błony jest powszechną odpowiedzią na ujemne niedopasowanie hydrofobowe. Dotychczas w literaturze poświęcono jednak bardzo niewiele uwagi analizie kosztu termodynamicznego takiego zaburzenia błony wynikającego z obecności ujemnego niedopasowania hydrofobowego.

W związku z tym, za cel postawiłem sobie precyzyjne określenie zmiany energii swobodnej towarzyszącej przeniesieniu modelowej inkluzji z domeny błonowej w której jest ona

hydrofobowo dopasowana, do domeny, w której dochodzi do ścienienia błony wskutek ujemnego niedopasowania hydrofobowego. Ponadto, interesowało mnie, w jaki sposób oddziaływania dyspersyjne oraz elektrostatyczne pomiędzy poszczególnymi składnikami układu wpływają na koszt wytworzenia niedopasowania hydrofobowego.

## **2. Określenie roli niedopasowania hydrofobowego w asocjacji inkluzji błonowych.**

Jedną z kluczowych odpowiedzi na niedopasowanie hydrofobowe jest asocjacja inkluzji. Moim celem było zrozumienie, jak energia swobodna układu zmienia się w zależności od odległości między dwiema modelowymi inkluzjami przy różnych wartościach niedopasowania hydrofobowego. W celu uzyskania bardziej precyzyjnego opisu tego procesu na poziomie molekularnym, zamierzałem także wyznaczyć wkłady do energii swobodnej asocjacji pochodzące od oddziaływań dyspersyjnych oraz elektrostatycznych pomiędzy różnymi składnikami układu.

Interesowało mnie również zrozumienie, czy zarówno ujemne, jak i dodatnie niedopasowanie hydrofobowe wpływają na asocjację inkluzji w podobny sposób. Ponadto chciałem zbadać, jaka jest relacja między upakowaniem lipidów a niedopasowaniem hydrofobowym jako siłą napędową do asocjacji. Zamierzałem także ustalić, w jaki sposób ładunek elektryczny inkluzji wpływa na stabilność jej dimerów indukowanych niedopasowaniem hydrofobowym.

## **3. Określenie roli niedopasowania hydrofobowego w segregacji inkluzji pomiędzy domenami błonowymi o różnym stopniu uporządkowania konformacyjnego.**

Większość inkluzji błonowych wykazuje pewną preferencję do lokalizowania się w obrębie domen błonowych o określonym stopniu uporządkowania konformacyjnego lipidów. Interesowało mnie zrozumienie wpływu niedopasowania hydrofobowego na segregację inkluzji między tymi domenami. W tym celu zaplanowałem analizę zmian energii swobodnej towarzyszących przeniesieniu inkluzji błonowych między domenami, przy różnych wartościach niedopasowania hydrofobowego. Obliczone energie swobodne przeniesienia zamierzałem także poddać dekompozycji, w celu ustalenia, które wkłady sprzyjają lokalizacji inkluzji w obrębie domen o wyższym lub niższym stopniu uporządkowania.

## **4. Weryfikacja wniosków płynących z badań nad modelowymi inkluzjami z wykorzystaniem rzeczywistych układów o znaczeniu biologicznym.**

Celem tego zadania było zweryfikowanie, w jakim stopniu wnioski uzyskane z badań nad modelowymi inkluzjami są uniwersalne i mogą zostać wykorzystane do lepszego zrozumienia mechanizmów odpowiedzi rzeczywistych układów błonowych na niedopasowanie hydrofobowe.

Konkretnie, interesowało mnie ustalenie, jak istotnym czynnikiem jest niedopasowanie hydrofobowe jako siła napędowa asocjacji cząsteczek, które, w przeciwieństwie do modelo-



wych inkluzji, tworzą również specyficzne oddziaływania między sobą. W związku z tym zamierzałem zbadać rolę niedopasowania hydrofobowego w trzech różnych przypadkach asocjacji: i) wiązania się cholesterolu z prostymi peptydami, ii) wiązania peptydu z białkiem enzymatycznym oraz iii) oligomeryzacji peptydów tworzących w błonie pory wodne.

W ramach tego zadania założyłem także zbadanie wpływu niedopasowania hydrofobowego na reorientację karotenoidów pod wpływem ich fotoizomeryzacji, która prowadzi do zmiany ich efektywnej długości hydrofobowej. Dodatkowo, postanowiłem także zbadać, w jakim stopniu niedopasowania hydrofobowe odpowiedzialne jest za zmianę właściwości fizykochemicznych błon spowodowaną dodatkiem alkoholi o różnej długości łańcuchów alkilowych.

W realizacji powyższych czterech zadań posłużyłem się pełnoatomową dynamiką molekularną. Wybór tej metody wynikał z konieczności analizy subtelnej równowagi sił rządzących samorzutnością procesów błonowych. W szczególności zależało mi na uzyskaniu precyzyjnego opisu oddziaływań lipid-lipid oraz lipid-rozpuszczalnik, przy pełnym uwzględnieniu entropii konformacyjnej łańcuchów acylowych. Dzięki takiemu precyzyjnemu opisowi łatwiej jest osiągnąć zgodność z wynikami doświadczalnymi *in vitro*. Co więcej, symulacje atomistyczne pozwalają na ogół na głębsze zrozumienie badanych mechanizmów i sił napędowych w badanych układach.



# Metody obliczeniowe

### 3.1 Dynamika molekularna

Badania naukowe w dziedzinie biologii napotykać na liczne wyzwania, takie jak pełne zrozumienie mechanizmów biomolekularnych, które leżą u podstaw funkcjonowania żywych organizmów [107, 108]. Postęp metod doświadczalnych umożliwia eksplorację układów z coraz większą rozdzielczością, aż do skali atomowej czy nawet subatomowej [109]. Eksperymenty laboratoryjne często napotykać na różne bariery, takie jak ograniczona rozdzielczość przestrzenna lub czasowa, bądź wysokie koszty. Stąd wynika potrzeba wykorzystania modeli teoretycznych i symulacji komputerowych, które stanowią cenne narzędzie uzupełniające podejście eksperymentalne.

Najbardziej naturalne i bezpośrednie podejście do symulowania układów molekularnych mogłoby się opierać na przewidywaniu ewolucji czasowej układu na poziomie atomowym z wykorzystaniem praw mechaniki kwantowej, w szczególności zależnego od czasu równania Schrödingera [110]. Niestety, ze względu na ogromne koszty obliczeniowe, podejście oparte na pełnej funkcji falowej do opisu układu jest ograniczone do bardzo małych układów, złożonych zazwyczaj z co najwyżej kilka atomów. Dlatego w symulacjach biomolekuł często wprowadza się uproszczenia, w szczególności traktując ruch jąder atomowych w sposób klasyczny [111–113].

W ramach tych uproszczeń, powszechnie stosuje się podejście oparte na dynamice molekularnej (MD), w którym ruch jąder jest opisany za pomocą równań dynamiki Newtona. Siły oddziałujące na te jądra mogą być obliczane na dwa główne sposoby. W pierwszym podejściu, nazywanym dynamiką molekularną *ab initio*, rozwiązuje się dla elektronów seryjnie niezależne od czasu równanie Schrödingera dla kolejnych konfiguracji jąder. Ta metoda sprawdza się w przypadku relatywnie niewielkich układów (do kilkuset atomów) i pozwala m.in. na badanie reakcji chemicznych.

Alternatywnie, siły oddziałujące na jądra mogą być obliczane z wykorzystaniem tzw. pól siłowych, czyli empirycznych funkcji energii, których zadaniem jest aproksymowanie rzeczywistej hiperpowierzchni energii potencjalnej układu molekularnego. W przeciwieństwie do metod *ab initio*, metody oparte na polach siłowych charakteryzują się lepszą wydajnością obliczeniową, co umożliwia eksplorację układów molekularnych o większych rozmiarach i/lub w dłuższych skalach czasowych. Kosztem, jaki płacimy za wysoką wydajność w przypadku pól siłowych, jest brak możliwości precyzyjnego modelowania reakcji chemicznych.



W przypadku eksploracji procesów chemicznych zachodzących w dużych układach biologicznych, takich jak reakcje enzymatyczne, często stosuje się podejście hybrydowe (QM/MM). W ramach tego podejścia siły działające na jądra w interesującym nas obszarze (np. w centrum katalitycznym) są obliczane z wykorzystaniem mechaniki kwantowej, podczas gdy siły dla pozostałej części są wyznaczone przy użyciu pól siłowych [114]. Takie podejście stanowi kompromis między kosztem a dokładnością obliczeń, a także umożliwia badanie reakcji chemicznych.

Dzięki dynamice molekularnej, obecnie możliwe jest badanie ewolucji czasowej układów biomolekularnych w szerokim zakresie czasowym, od femtosekund do setek milisekund [115]. Symulacje MD mogą być stosowane dla układów składające się z setek milionów atomów [116], co umożliwia badanie wielu zjawisk fizycznych w układach (bio)molekularnych, takich jak zmiany konformacyjne i zwijanie białek, przemiany fazowe czy asocjacje cząsteczek.

### 3.2 Propagacja ruchu

Celem dynamiki molekularnej jest predykcja trajektorii, a więc zachowania układu molekularnego w czasie. Symulowane atomy podlegają równaniom ruchu, które przyjmują postać układu równań różniczkowych zwyczajnych drugiego rzędu, o następującej postaci (3.1):

$$\frac{d^2 \mathbf{R}_i(t)}{dt^2} = \frac{-1}{m_i} \nabla_{\mathbf{R}_i} V(\mathbf{R}), \quad i = 1, 2, 3, \dots, N, \quad (3.1)$$

gdzie  $\mathbf{R}_i$  oraz  $m_i$  to położenie oraz masa  $i$ -tego atomu,  $V(\mathbf{R})$  jest energią potencjalną układu, a  $\nabla_{\mathbf{R}_i}$  oznacza gradient, czyli wektor pochodnych cząstkowych względem składowych położenia  $\mathbf{R}_i$ . Takiego układu równań nie da się rozwiązać w sposób ścisły przy pomocy metod analitycznych, a w związku z tym wykorzystuje się metody numeryczne (tzw. integratory), w których czas jest dyskretyzowany.

Jednym z popularnych integratorów, wykorzystywanych w dynamice molekularnej jest tzw. algorytm Verleta [117]. Podstawa tej metody opiera się na rozwinięciu funkcji położenia atomów od czasu wokół punktu  $t$  w szereg Taylora według równań 3.2 i 3.3:

$$\mathbf{X}(t + \Delta t) = \mathbf{X}(t) + \dot{\mathbf{X}}(t) \cdot \Delta t + \frac{1}{2!} \ddot{\mathbf{X}}(t) \cdot \Delta t^2 + \frac{1}{3!} \ddot{\ddot{\mathbf{X}}}(t) \cdot \Delta t^3 + \dots \quad (3.2)$$

$$\mathbf{X}(t - \Delta t) = \mathbf{X}(t) - \dot{\mathbf{X}}(t) \cdot \Delta t + \frac{1}{2!} \ddot{\mathbf{X}}(t) \cdot \Delta t^2 - \frac{1}{3!} \ddot{\ddot{\mathbf{X}}}(t) \cdot \Delta t^3 + \dots \quad (3.3)$$

Następnie, poprzez dodanie do siebie stronami równań 3.2 i 3.3 oraz zaniedbanie członów wyższych rzędów, uzyskuje się wzór na położenie atomów w kolejnym kroku czasowym (3.4):

$$\mathbf{X}(t + \Delta t) = 2\mathbf{X}(t) - \mathbf{X}(t - \Delta t) + \ddot{\mathbf{X}}(t) \cdot \Delta t^2 + \mathcal{O}(\Delta t^4). \quad (3.4)$$

Natomiast odjęcie tych samych równań i zaniedbanie członów wyższego rzędu pozwala na uzyskanie informacji o prędkościach atomów w kolejnym kroku czasowym (3.5):

$$\dot{X}(t + \Delta t) = \frac{X(t + \Delta t) - X(t - \Delta t)}{2\Delta t} + \mathcal{O}(\Delta^2 t). \quad (3.5)$$

Algorytm Verleta ma wiele zalet, takich jak prostota implementacji i symplektyczność, co oznacza, że całkowita energia układu (hamiltonian) w trakcie symulacji oscyluje wokół stałej wartości w trakcie ewolucji czasowej realizowanej w zespole mikrokanonicznym [118]. Jednak metoda ta ma pewne ograniczenia, takie jak niższa precyzja wyznaczania prędkości niż położenia.

W celu poprawy precyzji wyznaczania trajektorii stosuje się powszechnie dwa warianty algorytmu Verleta: tzw. wariant prędkościowy [119], który skupia się na poprawie obliczeń prędkości cząsteczek a także algorytm żabiego skoku [120]. Możliwe jest również wykorzystanie informacji z większej liczby poprzedzających kroków czasowych ( $t - 2\Delta t$ ,  $t - 3\Delta t$ , itd.) oraz wyższych pochodnych równań 3.2 i 3.3 [119, 121, 122].

### 3.3 Energia potencjalna układu

Aby opisać ewolucję układu w dynamice molekularnej, potrzebne jest wyznaczenie przyspieszenia  $A(t)$ , które jest związane z siłą  $F$  i masą  $m$  poprzez drugą zasadę dynamiki Newtona:  $F = m \cdot A$ . Jeśli przyjmiemy, że siłę działającą na atom można przedstawić jako ujemny gradient energii potencjalnej układu ( $U(X)$ ), wówczas przyspieszenie danego atomu można wyrazić jako:

$$A(t) = \frac{F(X)}{m} = \frac{-1}{m} \frac{\partial U(X)}{\partial X}. \quad (3.6)$$

Energia potencjalna układu zależy od położenia wszystkich atomów w układzie i można ją bez utraty ogólności zdekomponować zgodnie z równaniem 3.7:

$$U(X) = U(x_1, x_2, \dots, x_N) = U_0 + \sum_{i=1}^N U_1(x_i) + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N U_2(x_i, x_j) + \dots \quad (3.7)$$

W kontekście symulacji układów biomolekularnych uwzględnia się zwykle człony zależne od położenia dwóch, trzech lub czterech atomów, a także, gdy układ poddany jest działaniu zewnętrznych pól, człony jednociałowe. Najpopularniejsze pola siłowe stosowane w symulacjach biomolekularnych opisują energetykę wiązań kowalencyjnych, kątów walencyjnych, kątów torsyjnych, a także oddziaływań dyspersyjnych i elektrostatycznych.

#### 3.3.1 Energia potencjalna oddziaływań wiążących

W przypadku symulacji biomolekularnych najczęściej stosowanym wkładem odpowiadającym za opis energetyki wiązań kowalencyjnych jest potencjał harmoniczny. Wyraża się go następującym wzorem (3.8):

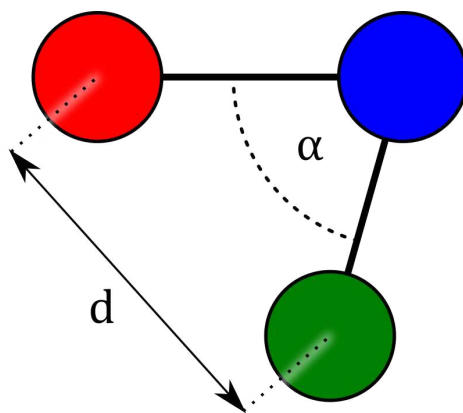
$$U(d) = \frac{1}{2}k(d - d_0)^2, \quad (3.8)$$

gdzie  $d$  jest aktualną długością wiązania, a  $d_0$  jest wartością referencyjną (równowagową). Potencjał harmoniczny stanowi adekwatny opis zachowania wiązań kowalencyjnych w relatywnie niskich temperaturach (np. 298 K), w których długość wiązania oscyluje wokół wartości referencyjnej z małą amplitudą. Warto jednak w tym miejscu zauważyć, że rzeczywiste wiązania kowalencyjne cechują się anharmonicznością, co oznacza, że w wyrażeniu na energię potencjalną wiązania należałoby uwzględnić człony wyższe niż harmoniczny (drugiego rzędu). Ponadto, zastosowanie potencjału harmonicznego do opisu energetyki wiązania wyklucza możliwość jego dysocjacji.

### 3.3.2 Energia potencjalna kątów walencyjnych

Do modelowania kątów walencyjnych (tj. tworzonych przez dwa przyległe wiązania kowalencyjne) najczęściej wykorzystuje się także potencjał harmoniczny. Jedną z możliwości polega na zastosowaniu tzw. potencjału Urey-Bradleya (Rys. 3.1) w którym występują dwa człony odpowiadające za niezależną kontrolę wartości kąta  $\alpha$  oraz odległości  $d$  między skrajnymi atomami:

$$U(\alpha, d) = \frac{1}{2}k_{\alpha} (\alpha - \alpha_0)^2 + \frac{1}{2}k_d (d - d_0)^2. \quad (3.9)$$



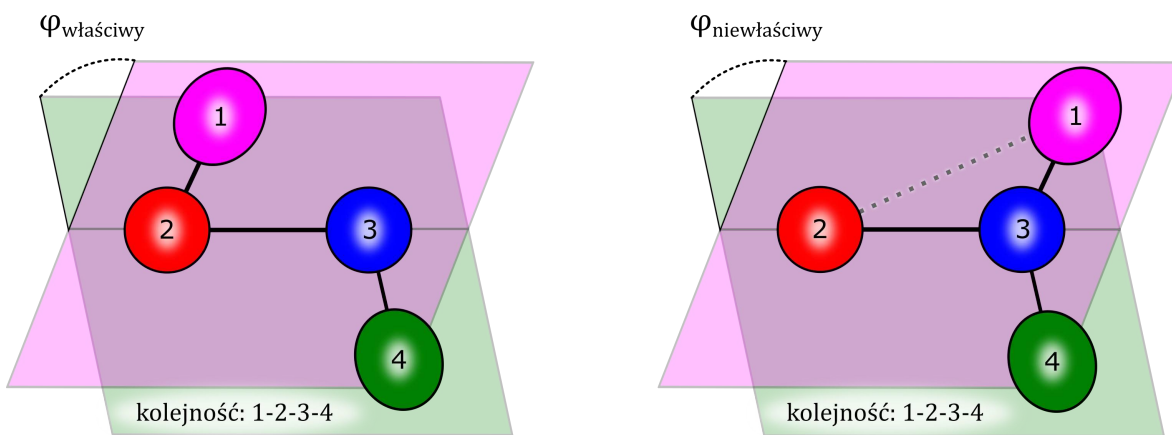
Rys. 3.1: Schematyczne przedstawienie kąta walencyjnego oraz parametrów  $\alpha$  i  $d$ , używanych w potencjale Urey-Bradleya, służącym do opisu energetyki kątów walencyjnych.

W większości zastosowań pomija się w równaniu 3.9 człon działający na odległość między skrajnymi atomami  $d$ .

### 3.3.3 Energia potencjalna obrotów wokół wiązań

Kąt torsyjny jest miarą rotacji wokół wiązań chemicznych. Zgodnie z Rys. 3.2 definiowany jest jako kąt pomiędzy płaszczyzną utworzoną przez atomy: 1–2–3 a płaszczyzną utworzoną przez atomy 2–3–4. Gdy te cztery atomy są połączone sekwencyjnie wiązaniami kowalencyjnymi (tj. 1–2, 2–3, 3–4), kąt ten jest nazywany właściwym kątem torsyjnym. W przypadku, gdy nie są połączone w tej sekwencji, kąt torsyjny określa się jako niewłaściwy.





**Rys. 3.2:** Schematyczne przedstawienie kąta torsyjnego właściwego i niewłaściwego. Różowym kolorem oznaczono płaszczyznę utworzoną przez atomy 1-2-3, natomiast zielony kolor reprezentuje płaszczyznę utworzoną przez atomy 2-3-4. Kąt torsyjny określa się jako kąt pomiędzy dwiema płaszczyznami - różową i zieloną. Wiązania kowalencyjne cząsteczki są przedstawione za pomocą ciągłych linii.

Do opisu właściwych kątów torsyjnych najczęściej stosuje się następujący potencjał (3.10):

$$U_{\text{proper}}(\varphi) = k_{\varphi} [1 + \cos(n\varphi - \varphi_0)], \quad (3.10)$$

gdzie  $k_{\varphi}$  określa wysokość bariery energetycznej dla rotacji,  $n$  jest krotnością wiązania, określającą liczbę minimów podczas pełnego obrotu wiązania,  $\varphi_0$  jest arbitralną fazą.

Niewłaściwe kąty torsyjne są zazwyczaj używane do utrzymania płaskiej geometrii cząsteczek wokół atomów węgla o hybrydyzacji  $sp^2$  lub do zachowania chiralności asymetrycznych atomów węgla. W tym celu stosuje się funkcję kary, która często ma postać potencjału harmonicznego (3.11):

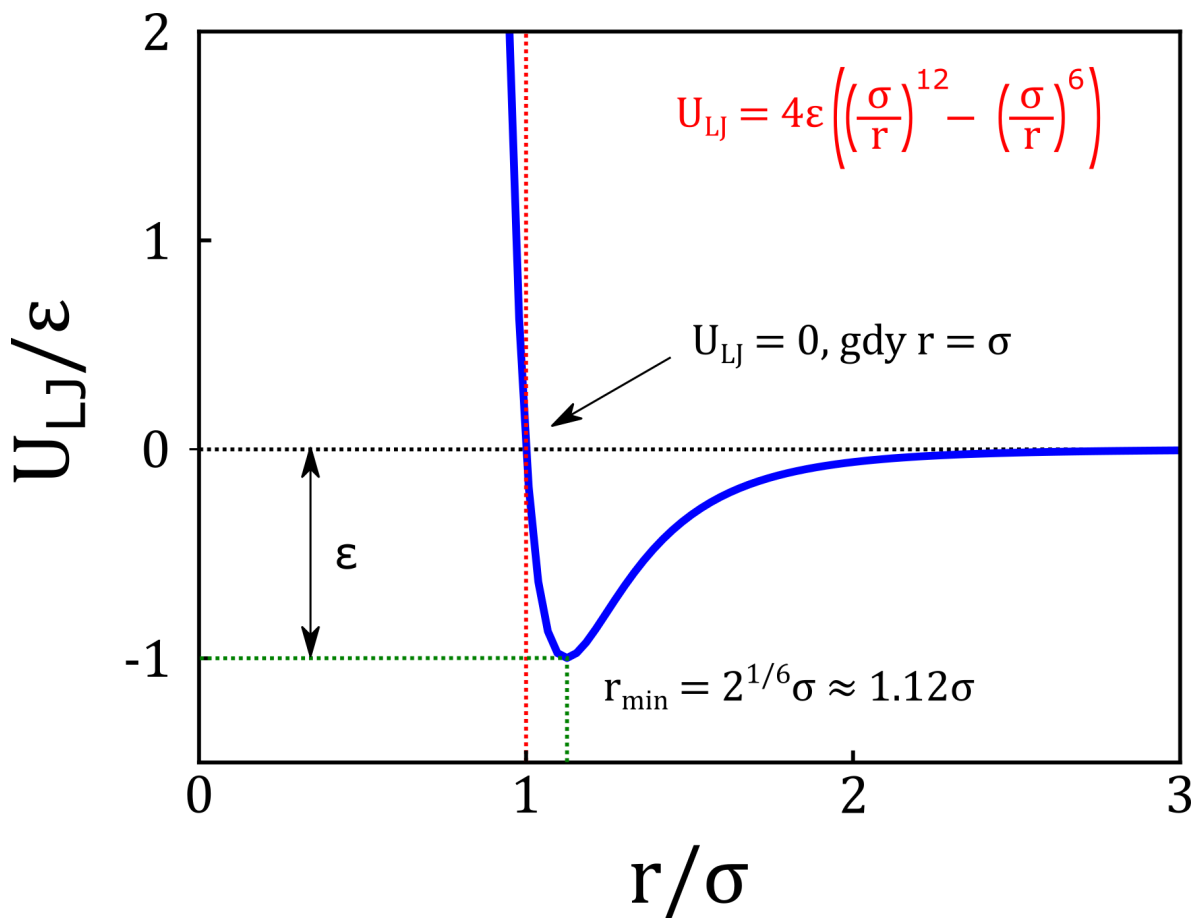
$$U_{\text{improper}} = \frac{1}{2} k_{\varphi} (\varphi - \varphi_0)^2. \quad (3.11)$$

### 3.3.4 Energia potencjalna oddziaływań dyspersyjnych

Do opisu oddziaływań dyspersyjnych najczęściej stosuje się potencjał Lennarda-Jonesa (LJ), którego wzór przedstawia się następująco:

$$U_{\text{LJ}} = 4\epsilon \left( \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right). \quad (3.12)$$

Kształt krzywej potencjału Lennarda-Jonesa opisującej oddziaływania dyspersyjne został przedstawiony na Rys. 3.3. W równaniu 3.12 występują dwa parametry:  $\epsilon$  i  $\sigma$ . Parametr  $\epsilon$  reprezentuje głębokość energetycznego minimum, a  $\sigma$  określa miejsce, w którym energia potencjalna wynosi zero, a także kontroluje położenie minimum potencjału zgodnie ze wzorem  $r_{\text{min}} = 2^{1/6}\sigma$ . Pierwszy człon tego równania,  $(\sigma/r)^{12}$ , opisuje siły odpychające między atomami, podczas gdy drugi,  $(\sigma/r)^6$  opisuje przyciąganie.



Rys. 3.3: Przykład krzywej opisującej oddziaływania dyspersyjne zgodnie z potencjałem Lennarda-Jonesa (LJ). Parametr  $\epsilon$  określa głębokość energetycznego minimum, co ma wpływ na siłę oddziaływań przyciągających między dwoma atomami, natomiast parametr  $\sigma$  określa położenie, w którym potencjał  $U_{LJ}$  osiąga wartość zero, a dodatkowo determinuje położenie minimum potencjału.

Wykładnik “6” w członie opisującym oddziaływania przyciągające można uzasadnić na podstawie kwantowego rachunku zaburzeń [123]. W przypadku członu opisującego oddziaływania odpychające, używane są różne funkcje o dużym nachyleniu ujemnym, przy czym najpopularniejszą z nich jest wyrażenie  $(\sigma/r)^{12}$ . Jest ono *de facto* kwadratem członu odpowiadającego za oddziaływania przyciągające, co pozwala na obniżenie kosztów obliczeń. Alternatywnie, do opisu oddziaływań odpychających stosuje się również funkcję wykładniczą [124, 125].

### 3.3.5 Energia potencjalna oddziaływań elektrostatycznych

Do opisu oddziaływań elektrostatycznych wykorzystuje się zwykle prawo Coulomba w następującej postaci (3.13):

$$U_{\text{Coul}} = \frac{z_i z_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r}. \quad (3.13)$$

W równaniu 3.13 parametr  $\epsilon_0$  oznacza przenikalność elektryczną próżni,  $\epsilon_r$  to względna przenikalność ośrodka, natomiast  $z_i$  oraz  $z_j$  reprezentują ładunki cząstkowe atomów oddziaływających ze sobą. Potencjał Coulomba jest skuteczny w opisie oddziaływań elektrostatycznych, pod warunkiem, że ładunki cząstkowe są stałe w czasie.

### 3.3.6 Pole siłowe

Mianem “pola siłowego” określamy prosty model opisujący oddziaływania w układzie, pozwalający na przybliżony opis hiperpowierzchni energii potencjalnej. Funkcyjna postać pola siłowego (3.14) zawiera addytywne wkłady opisujące oddziaływania wiążące (bonded, 3.15), oddziaływania międzyatomowe (nonbonded, 3.16) oraz dodatkowy wkład (external), wynikający z dodawanych więzów:

$$U_{\text{total}} = U_{\text{bonded}} + U_{\text{nonbonded}} + U_{\text{external}} \quad (3.14)$$

$$U_{\text{bonded}} = U_{\text{bonds}} + U_{\text{angles}} + U_{\text{torsions}} \quad (3.15)$$

$$U_{\text{nonbonded}} = U_{\text{LJ}} + U_{\text{Coul}} \quad (3.16)$$

Parametry pola siłowego są często dobierane na podstawie obliczeń *ab initio*. W dziedzinie symulacji biomolekularnych stosuje się wiele różnych pól siłowych, które mogą różnić się postacią funkcyjną poszczególnych członów a także wartościami parametrów opisujących oddziaływania (np. inna wartość stałej siłowej). Niektóre z tych pól siłowych są (relatywnie) uniwersalne, jak UFF [126], podczas gdy inne są wyspecjalizowane w opisie węższej klasy cząsteczek, takich jak białka, lipidy błonowe, kwasy nukleinowe czy cukry. Wśród tych wyspecjalizowanych pól siłowych można wymienić AMBER [127], CHARMM [128] oraz GROMOS [129].

## 3.4 Wydajność obliczeniowa

Wydajność obliczeniowa odgrywa kluczową rolę w kontekście symulacji dynamiki molekularnej, ponieważ to od niej zależy, jakie rodzaje procesów i w jakiej skali czasowej mogą być badane przy użyciu metod komputerowych. Wydajność określa również, czy jesteśmy w stanie modelować te procesy w sposób dokładny i efektywny. Wydajność obliczeniową symulacji MD można wyrazić w jednostce [ns/dzień], co pozwala określić, jak długą ewolucję układu (w ns) można uzyskać w ciągu jednego dnia obliczeń. Ta wielkość umożliwia oszacowanie czasu potrzebnego do przeprowadzenia symulacji lub określenia, jakie procesy biologiczne można zbadać. Wydajność obliczeniową determinuje wiele czynników związanych zarówno z przyjętymi założeniami, jak i zastosowanymi metodami.

### 3.4.1 Krok czasowy

Ważnym aspektem w symulacjach jest właściwy dobór kroku czasowego ( $\Delta t$ ). Można założyć, że zwiększenie wartości  $\Delta t$  pozwoli na wydłużenie trajektorii dynamicznej generowanej w symulacji. Jednakże zastosowanie zbyt długiego kroku czasowego może prowadzić do niestabilności w ruchu cząsteczek, ze względu na nadmierny błąd obciążenia przy całkowaniu równań ruchu [130]. W takim przypadku energia całkowita układu może gwałtownie wzrosnąć w miarę upływu czasu, co ostatecznie prowadzi do przerwania symulacji.



W związku z tym wartość  $\Delta t$  dobierana jest w wyniku kompromisu pomiędzy wydajnością obliczeniową a stabilnością numeryczną symulacji.

Teoria Nyquista-Shannona wskazuje, że maksymalny krok czasowy dla ruchów oscylacyjnych nie może przekraczać połowy okresu najkrótszych drgań [131]. Na przykład, dla drgań rozciągających wiązań O-H, gdzie najwyższa częstotliwość wynosi około  $3500\text{ cm}^{-1}$ , okres drgań wynosi około 10 fs. Wobec tego  $\Delta t$  może wynosić maksymalnie 5 fs. Jednak praktyka pokazuje, że dla zapewnienia numerycznej stabilności symulacji niezbędne jest zwykle zastosowanie kroku czasowego równego 1 fs.

Z drugiej strony, w przypadku temperatur bliskich pokojowej, ruchy termiczne nie są wystarczające do wzbudzenia oscylatorów wiązań kowalencyjnych na wyższe poziomy energetyczne. Wobec tego, zasadne jest zamrożenie długości wiązań w celu skorygowania niefizycznej pojemności cieplnej układu wynikającej z zastosowania klasycznego oscylatora harmonicznego do opisu energetyki wiązań. Takie podejście pozawala także na wydłużenie kroku czasowego, przy jednocześnie zapewnionej stabilności numerycznej symulacji. Wśród technik służących do nakładania więzów (ang. constraints), a zatem umożliwiających m.in. zachowanie stałej długości wiązań, wymienić można algorytmy SHAKE, RATTLE i LINCS [132–134]. Dzięki ich zastosowaniu symulacje biomolekularne prowadzi się zwykle z krokiem czasowym  $\Delta t = 2\text{ fs}$ .

### 3.4.2 Oddziaływania międzycząsteczkowe

W symulacjach dynamiki molekularnej jednym z kluczowych elementów wpływających na czas obliczeń jest koszt obliczeniowy algorytmów służących do wyznaczania sił działających pomiędzy atomami. Zadanie to wymaga zwykle obliczenia odległości pomiędzy każdą parą atomów w układzie, co prowadzi do niekorzystnej złożoności obliczeniowej, proporcjonalnej do  $N^2$ , gdzie  $N$  jest liczbą atomów w układzie. Aby zwiększyć wydajność, stosuje się zatem różne techniki numeryczne, które zostaną przedstawione poniżej.

Przed wszystkim można zastosować promień odcięcia  $r_{\text{cut}}$ , powyżej którego potencjał dla oddziaływań międzycząsteczkowych przyjmuje wartość zero. Zastosowanie promienia odcięcia zmniejsza liczbę oddziaływań międzycząsteczkowych, które muszą być uwzględnione w symulacji, co znacznie przyspiesza obliczenia. Jednakże, wiąże się to także z pewnymi problemami. Ponieważ oddziaływania międzycząsteczkowe są ograniczone tylko do atomów znajdujących się w określonej odległości, energia układu nie jest dokładnie zachowana, co prowadzi do dryfu energii. Aby temu zapobiec, stosuje się tzw. przesunięcie potencjału, które eliminuje nieciągłość potencjału w odległości  $r_{\text{cut}}$ . Alternatywnie, można zastosować promień wyłączenia ( $r_{\text{switch}}$ ) mniejszy niż promień odcięcia, powyżej którego potencjał zmniejsza się płynnie do zera.

Aby stosowanie promienia odcięcia umożliwiło redukcję kosztu obliczeniowego, dodatkowo stosuje się algorytmy przechowujące listy sąsiadów dla każdego atomu, z których najpopularniejszym jest lista sąsiadów Verleta [117]. W tej metodzie odległości między



atomami są wyznaczane co pewną liczbę kroków symulacyjnych  $\Delta t$  (np 10 lub 20), a informacje o atomach znajdujących się w najbliższym sąsiedztwie są przechowywane w liście Verleta. W kolejnych krokach symulacji obliczenia sił dotyczą tylko par atomów znajdujących się na tych listach. Można również tworzyć dwie różne listy sąsiadów Verleta, jedną dla sąsiedztwa w promieniu  $r_{\text{cut}}$  i drugą dla sąsiedztwa w zakresie  $r_{\text{cut}} < r < r_{\text{list}}$ , co pomaga w redukcji fluktuacji energii. W praktyce, lepszą wydajność uzyskuje się poprzez zastosowanie  $r_{\text{cut}} = r_{\text{list}}$  oraz parametru określającego tolerancję dla dryfu energii.

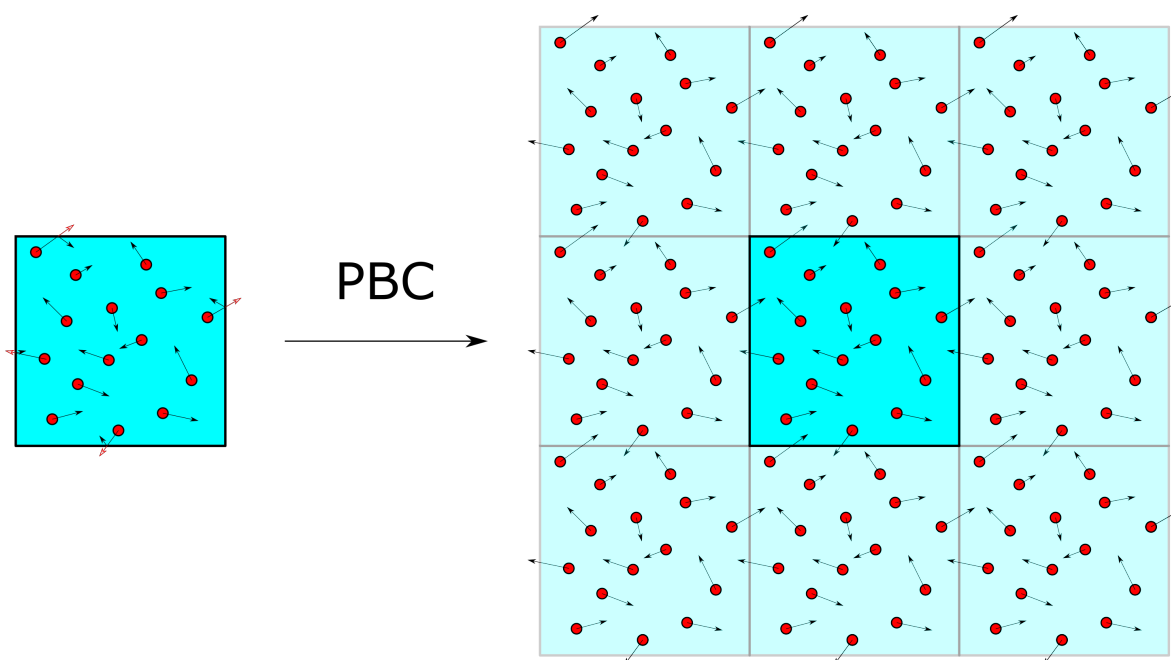
W przypadku oddziaływań elektrostatycznych, zastosowanie promienia odcięcia może okazać się niewystarczające. W celu dokładniejszego uwzględnienia dalekozasięgowych oddziaływań elektrostatycznych wykorzystuje się zaawansowaną technikę znaną jako (ang.) Particle-Mesh Ewald (PME). W tej metodzie oddziaływania elektrostatyczne są podzielone na dwie kategorie: oddziaływania krótkozasięgowe i oddziaływania dalekozasięgowe. Oddziaływania krótkozasięgowe są obliczane bezpośrednio poprzez wyznaczenie energii kulombowskiej między odpowiednimi parami cząsteczek. Natomiast w przypadku oddziaływań dalekozasięgowych, wykorzystuje się siatkę, która zawiera równomiernie rozmieszczone punkty, na które zostają interpolowane ładunki atomów. Następnie, za pomocą transformaty Fouriera, obliczenia przenoszone są z przestrzeni rzeczywistej do przestrzeni odwrotnej. Dzięki temu rozwiązanie równania Poissona, opisującego pole elektrostatyczne, staje się znacznie bardziej efektywne obliczeniowo. W końcowym etapie, za pomocą odwrotnej transformaty Fouriera, wyznaczone są rzeczywiste siły oddziałujące na poszczególne atomy. Warto również zaznaczyć, że ze względu na możliwość użycia tzw. szybkiej transformaty Fouriera (FFT) złożoność obliczeniowa wyznaczania sił elektrostatycznych redukuje się z kosztownej zależności  $N^2$  do niemal liniowej  $N \log(N)$ .

### 3.4.3 Wielkość układu

W symulacjach MD istotny jest dobór wielkości układu, czyli rozmiarów tzw. pudła symulacyjnego, w którym znajdują się atomy. Wybór odpowiednich rozmiarów ma kluczowe znaczenie dla uzyskania wiarygodnych wyników i wyeliminowania wpływu warunków brzegowych. Jednym z podejść jest zwiększenie rozmiarów pudła. Niestety, prowadzenie symulacji w większych pudłach wymaga większego nakładu obliczeniowego. Dlatego popularnym rozwiązaniem jest zastosowanie periodycznych warunków brzegowych (ang. Periodic Boundary Conditions, PBC) [135].







**Rys. 3.4:** Schematyczne przedstawienie okresowych warunków brzegowych (PBC), które polegają na otoczeniu układu jego kopiami ze wszystkich stron. Po lewej stronie przedstawiono układ bez zastosowania PBC. Czarnymi strzałkami zaznaczony rzeczywiste zmiany położenia cząsteczek w układzie, podczas gdy kolorem czerwonym zaznaczono położenia cząsteczek, gdyby układ nie zawierał ścian potencjału na brzegu pudła symulacyjnego. Po prawej stronie pokazano układ symulacyjny otoczony kopiami tego samego układu. Na rysunku ukazano przykład dwuwymiarowy z zastosowaniem PBC, co pozwala traktować układ jako nieskończenie rozległy.

Zastosowanie PBC opiera się na powielaniu układu w jednej, dwóch lub trzech współrzędnych kartezjańskich, zgodnie z Rys. 3.4. Dzięki temu możliwa jest aproksymacja nieskończonego układu za pomocą małej komórki elementarnej. W praktyce, taki zabieg powoduje, że kiedy cząsteczka opuszcza pudło symulacyjne, jej okresowy obraz pojawia się po przeciwnej stronie tego pudła. Aby uniknąć artefaktów związanych z okresowością, w przypadku wykorzystania PBC konieczne jest, żeby rozmiary pudeł były przynajmniej dwukrotnie większe od promieni odcięcia  $r_{cut}$ . Jest to szczególnie istotne dla zapobieżenia bezpośrednim oddziaływaniom pomiędzy przeciwnymi końcami tej samej makrocząsteczki.

Oprócz rozmiaru, istotny jest również wybór kształtu pudła symulacyjnego. W przypadku układów zawierających błony lipidowe, najczęściej stosowanym kształtem jest prostopadłościan. Poprzez zastosowanie okresowych warunków brzegowych w płaszczyźnie błony, możemy w prosty sposób modelować błonę lipidową o nieskończonej dużej powierzchni. W innych przypadkach stosuje się także odpowiednio dobrane trójskośne okresowe warunki brzegowe, w szczególności takie, dla których wielościany Voronia przyjmują kształt ośmio- bądź dwunastościanu. Pozwala to na zmniejszenie liczby cząsteczek wody, potrzebnych do solwatacji badanej cząsteczki w porównaniu do układu prostopadłościennego. To z kolei przekłada się na zwiększoną wydajność obliczeń.

### 3.5 Utrzymywanie stałych warunków fizycznych w symulacji

Podczas przeprowadzania symulacji dynamiki molekularnej, utrzymanie stałych warunków fizycznych ma kluczowe znaczenie dla dokładności i wiarygodności uzyskanych wyników. W tym celu wykorzystuje się specjalne algorytmy, znane jako “termostaty” i “barostaty”, które odgrywają istotną rolę w regulacji temperatury i ciśnienia w badanym układzie molekularnym. Algorytmy te pozwalają na stabilne i długotrwałe symulacje, co jest kluczowe w kontekście wielu badań z wykorzystaniem metod symulacyjnych.

Temperaturę  $T$  układu w mikroskopowym opisie określa się jako miarę średniej energii kinetycznej  $\overline{E_{\text{kin}}}$  cząsteczek w tym układzie. Można to wyrazić za pomocą wzoru (3.17):

$$\overline{E_{\text{kin}}} = \sum_{i=1}^N \frac{m_i v_i^2}{2} = \frac{3}{2} N k_B T, \quad (3.17)$$

gdzie  $N$  oznacza liczbę cząsteczek w układzie,  $m_i$  i  $v_i$  określają odpowiednio masę oraz prędkość  $i$ -tej cząsteczki, zaś  $k_B$  oznacza stałą Boltzmanna. Stąd wynika, że kontrolowanie temperatury w symulacjach molekularnych polega na regulowaniu prędkości cząsteczek, skalując je za pomocą parametru  $\lambda$ .

Jednym z powszechnie stosowanych termostatów jest termostat Berendsena [136], który korzysta z czynnika skalującego  $\lambda$  opisanego następującym równaniem:

$$\lambda = \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau} \left( \frac{T_{\text{ref}}}{T_t} - 1 \right)}. \quad (3.18)$$

W tym równaniu  $\Delta t$  reprezentuje krok czasowy symulacji,  $\tau$  to stała czasowa, która określa siłę sprzężenia układu z hipotetyczną łaźnią,  $T_{\text{ref}}$  oznacza zadaną temperaturę układu, a  $T_t$  to rzeczywista temperatura w czasie  $t$ .

Termostat Berendsena działa zatem na zasadzie tłumienia fluktuacji energii kinetycznej. To oznacza, że niemożliwe jest prawidłowe odtworzenie zespołu statystycznego (takiego jak zespół kanoniczny), co wprowadza pewien błąd w wynikach. Niemniej jednak, w przypadku dużych układów, stosowanie tego termostatu daje wyniki zbliżone do poprawnych dla wielu wielkości fizycznych obliczanych jako średnie po zespole, a błąd ten maleje w miarę wzrostu rozmiaru układu. Jednocześnie termostat Berendsena wpływa na uzyskanie zaniżonych wartości pojemności cieplnej w symulacjach molekularnych.

Alternatywną metodą utrzymania stałej temperatury, która jest pozbawiona wad algorytmu Berendsena, jest termostat Nosé-Hoovera [137, 138]. W podejściu tym wprowadza się dodatkowe (wirtualne) stopnie swobody związane z łaźnią termiczną. Łaźnia termiczna przechowuje część energii kinetycznej, którą oddaje lub pobiera z układu. Chociaż układ wraz z łaźnią termiczną, traktowany jako “rozszerzony układ”, jest symulowany w reżimie NVE (czyli przy zachowaniu stałej ilości cząsteczek  $N$ , objętości  $V$  i energii  $E$ ), to rzeczywisty układ jest utrzymywany w reżimie NVT (tj. przy zachowaniu stałej temperatury  $T$ ).

Barostaty są używane do utrzymania w trakcie symulacji stałego ciśnienia. Ich działanie polega na odpowiednim skalowaniu rozmiarów pudła symulacyjnego. Podobnie, jak

w przypadku temperatury, można wykorzystać barostaty oparte na czynniku skalującym  $\lambda$  (np. barostat Berendsena [136]), lub analogiczny do podejścia Nosé-Hoovera barostat Parrinello-Rahmana [139]. Istnieje możliwość kontrolowania ciśnienia w sposób izotropowy, semi-izotropowy (przydatne w przypadku symulacji zawierających błony lipidowe, gdzie osobno kontrolujemy ciśnienie w płaszczyźnie XY, a osobno wzdłuż osi Z) lub całkowicie anizotropowy, w zależności od potrzeb symulacji.

### 3.6 Przewidywanie zmian energii swobodnej w procesach biomolekularnych

Symulacje komputerowe stanowią narzędzie umożliwiające badanie różnorodnych procesów biomolekularnych. Obejmuje to takie procesy jak wiązanie makrocząsteczek, zmiany konformacyjne, zwijanie białek, dyfuzję oraz inne procesy transportu wewnątrz komórek. Ponadto, symulacje pozwalają na ocenę, w jaki sposób biomolekuły reagują na mutacje genetyczne, zmiany stanu sprotonowania, a także modyfikacje potranslacyjne, takie jak fosforylacja czy palmitylacja. Jednym z kluczowych aspektów symulacji jest możliwość określenia sił napędowych wymienionych procesów. Dzięki temu można zgłębiać mechanistyczne podłoże różnorodnych zjawisk w układach biomolekularnych oraz analizować wpływ zmian w strukturze biomolekuły lub we właściwościach fizykochemicznych otoczenia, takich jak grubość czy upakowanie błony, na ich funkcje.

Jednym z najważniejszych zastosowań symulacji MD jest eksploracja przestrzeni konfiguracyjnej układów biomolekularnych. Uzyskując odpowiednio długie trajektorie dynamiczne, można scharakteryzować kształt hiperpowierzchni energii swobodnej układu, której minima odpowiadają stanom termodynamicznie stabilnym. Jednakże dokładne wyznaczenie takiej hiperpowierzchni napotyka na ograniczenia, takie jak trudności w pokonaniu barier energetycznych, co może prowadzić do “zamknięcia” układu wyłącznie w jednym lub kilku minimach lokalnych energii swobodnej. W celu rozwiązania tych problemów wykorzystuje się metody wzmocnionego próbkowania (ang. enhanced sampling methods).

Niektóre z tych technik wykorzystują tzw. współzrędną reakcji, która jest współzrędną kolektywną zależną od położenia pewnej liczby lub nawet wszystkich atomów w układzie. Zazwyczaj stosowanymi współzrędnymi reakcji są odległości między dwiema cząsteczkami, kąty między cząsteczkami lub odchylenie średniokwadratowe (ang. root mean squared deviation, RMSD), które służy do pomiaru różnicy między strukturami białka od jego początkowej konformacji do konformacji końcowej. Wybór odpowiedniej współzrędnej reakcji umożliwia wizualizację zmian energii swobodnej wzdłuż naturalnej ścieżki prowadzącej od jednego stanu (na przykład konformacyjnego) do innego.

Inne metody opierają się na prowadzeniu symulacji w wielu replikach (ang. replica exchange molecular dynamics, REMD). W ramach REMD różne repliki układu są równocześnie symulowane przy różnych temperaturach lub z wykorzystaniem różnych hamiltonianów, tj. funkcji energii całkowitej. Okresowo, zgodnie ze zdefiniowanym kryterium, podejmowana jest próba wymiany konfiguracji między replikami. Aby zachować

właściwe zespoły równowagowe w poszczególnych replikach, wymiany są akceptowane tylko ze ściśle określonym prawdopodobieństwem.

Gdy interesuje nas różnica w termodynamice dwóch procesów (np. chcielibyśmy ustalić, który z dwóch substratów chętniej wiąże się z centrum katalitycznym enzymu) możliwe jest wyznaczenie względnych zmian energii swobodnej towarzyszących procesowi. Wśród metod umożliwiających oszacowanie tych względnych zmian energii swobodnej, ważne miejsce zajmują techniki alchemiczne. W ramach tych technik poszukiwaną względną zmianę energii swobodnej wyznacza się jako różnicę zmian energii swobodnej w procesach fizycznie niedostępnych, takich jak anihilacja cząsteczki lub jej fragmentu, albo bezpośrednie przekształcenie jej w inną cząsteczkę.

### 3.6.1 Umbrella Sampling

Próbkowanie parasolkowe (ang. umbrella sampling, US) jest jedną z popularniejszych technik pozwalających na wyznaczenie krzywej (bądź powierzchni) energii swobodnej jako funkcji jedno- lub kilkowymiarowych współrzędnych reakcji  $\zeta$  [140]. Metoda polega na poddaniu układu działaniu dodatkowych potencjałów  $U_{US}(\zeta)$  w wybranych punktach wzdłuż współrzędnej reakcji  $\zeta$ , w celu zwiększenia częstotliwości odwiedzania przez układ wysokoenergetycznych regionów przestrzeni konfiguracyjnej. Dzięki temu podejściu możliwe jest skuteczne próbkowanie całego interesującego nas zakresu  $\zeta$ , co umożliwia oszacowanie równowagowego rozkładu prawdopodobieństwa wzdłuż tej współrzędnej. Taki rozkład prawdopodobieństwa pozwala na scharakteryzowanie termodynamiki procesu opisanego przez tę konkretną współrzędną. Schematyczne przedstawienie próbkowania parasolkowego znajduje się na Rys. 3.5.

W praktyce efektywne próbkowanie współrzędnej  $\zeta$  osiąga się poprzez przeprowadzenie serii symulacji, w których zakresy współrzędnej  $\zeta$  w kolejnych symulacjach się nakładają. W każdej z tych symulacji używany jest dodatkowy potencjał  $U_i^{US}(\zeta)$ , który zapewnia, że układ w symulacji i utrzymuje się w okolicach wartości  $\zeta_i$ . Zazwyczaj potencjał ten przyjmuje postać potencjału harmonicznego, tj.  $U_i^{US}(\zeta) = 0.5 k_i (\zeta - \zeta_i)^2$ . Stąd też, efektywne próbkowanie całego zakresu  $\zeta$  wymaga dobrania odpowiedniej liczby tzw. okien  $n$ , położenia minimów potencjału  $\zeta_i$  oraz stałych siłowych  $k_i$ .

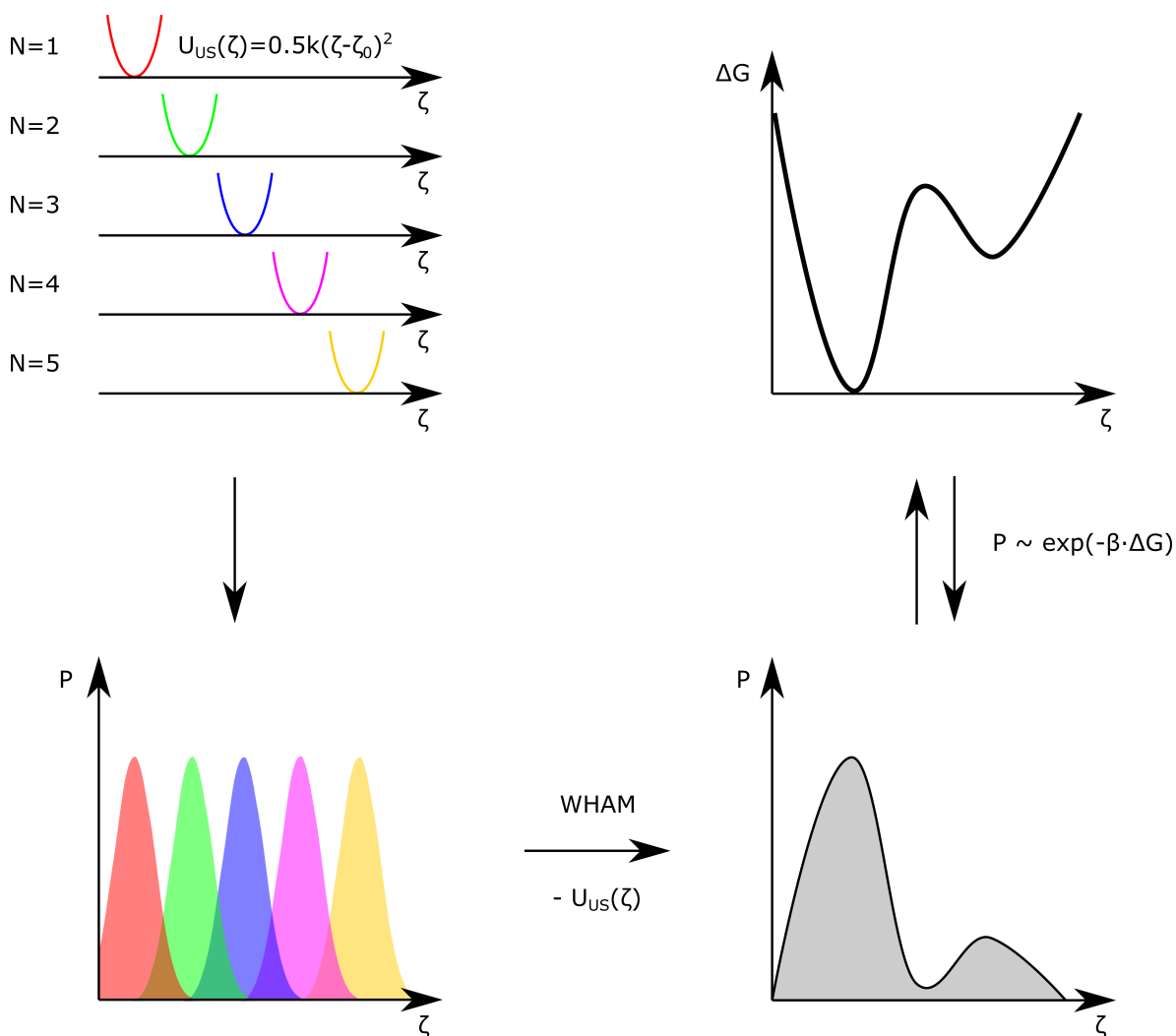
Aby wyznaczyć profil energii swobodnej, nieobciążony sztucznie przykładanym potencjałem, wykonuje się następującą operację 3.19:

$$G_i(\zeta) = -\frac{1}{\beta} \ln \rho_i^{US} - U_i^{US} + F_i, \quad \beta = \frac{1}{k_B T}, \quad (3.19)$$

gdzie  $\rho_i^{US}$  jest gęstością prawdopodobieństwa uzyskaną w symulacji z przyłożonym dodatkowym potencjałem  $U_i^{US}$ , natomiast stała  $F_i$  dla  $i$ -tego okna zdefiniowana jest jako:

$$\exp(-\beta F_i) = \left\langle \exp\left(-\beta U_i^{US}(\zeta)\right) \right\rangle. \quad (3.20)$$





Rys. 3.5: Schematyczne przedstawienie techniki próbkowania parasolkowego oraz procedury pozwalającej na uzyskanie profilu energii swobodnej w funkcji współrzędnej reakcji  $\zeta$ .

Oznacza to zatem, że stała  $F_i$  ma sens wkładu do energii swobodnej wynikającego z przyłożenia do układu zewnętrznego potencjału. Do wyznaczenia stałych  $F_i$  stosuje się szereg różnych metod, wśród których najpopularniejsza jest metoda ważonych histogramów (ang. weighted histogram analysis method, WHAM) [141]. W metodzie tej, globalny rozkład  $\rho(\zeta)$  obliczany jest jako średnia ważona rozkładów uzyskanych w poszczególnych oknach:

$$\rho(\zeta) = \sum_i^n w_i(\zeta) \rho_i(\zeta), \quad (3.21)$$

gdzie wagi poszczególnych okien  $w_i$  dobierane są w taki sposób, aby zminimalizować błąd statystyczny wyznaczenia globalnego rozkładu:

$$\frac{\partial \sigma^2(\zeta)}{\partial w_i} = 0. \quad (3.22)$$

Przyjmując również  $\sum_i w_i = 1$ , uzyskuje się następujące wyrażenia na wagę  $w_i$  oraz stałą  $F_i$ :

$$w_i = \frac{N_i \exp\left(-\beta U_i^{\text{US}}(\zeta) + \beta F_i\right)}{\sum_j N_j \exp\left(-\beta U_j^{\text{US}}(\zeta) + \beta F_j\right)}, \quad (3.23)$$

$$\exp(-\beta F_i) = \int \rho(\zeta) \exp\left(-\beta U_i^{\text{US}}(\zeta)\right) d\zeta. \quad (3.24)$$

Ponieważ  $w_i$  zależy od  $F_i$  i *vice versa*, ten układ równań rozwiązuje się metodą iteracyjną do uzyskania zbieżności, inicjując początkowe wartości  $F_i$ .

Warto nadmienić, że dobór liczby okien oraz stałej siłowej mogą wpłynąć w sposób pośredni na szybkość uzbieźniania się symulacji US; jednak dzielenie współrzędnej reakcji na zbyt wiele okien generuje wysoki koszt obliczeniowy. Zwykle możliwe jest przyspieszenie uzbieźnienia poprzez wykorzystanie tzw. wymiany replik (ang. replica exchange) [142]. W takich podejściu, co określoną liczbę kroków symulacji MD podejmowane są próby wymiany współrzędnych atomów pomiędzy sąsiadującymi parami replik. Wymiany są jest akceptowana lub odrzucana na podstawie kryterium Metropolis, czyli z prawdopodobieństwem danym wzorem:

$$P(j \rightarrow j+1) = \min\left(1, \exp\left[\frac{-U_j(r_{j+1}) + U_j(r_j)}{k_B T_j} + \frac{-U_{j+1}(r_j) + U_{j+1}(r_{j+1})}{k_B T_{j+1}}\right]\right), \quad (3.25)$$

gdzie  $k_B$  oznacza stałą Boltzmanna,  $U_j$  oraz  $U_{j+1}$  określają funkcję energii,  $r_j$  oraz  $r_{j+1}$  – konfigurację (położenia), zaś  $T_j$  oraz  $T_{j+1}$  – temperatury w oknach odpowiednio  $j$  oraz  $j+1$ . W przypadku symulowania obu replik w tej samej temperaturze  $T_j = T_{j+1}$ , wzór upraszcza się. Jeśli  $P$  przyjmuje wartość 1, następuje wymiana konfiguracji między oknami. W przypadku, gdy prawdopodobieństwo  $P$  przyjmuje wartość  $0 < P < 1$ , losuje się liczbę z zakresu  $[0,1]$  przy użyciu generatora liczb pseudolosowych. Jeżeli liczba ta jest większa od  $P$ , dochodzi do wymiany replik.

W przypadku symulacji z większą liczbą okien, proces decyzyjny odbywa się równolegle. W określonym kroku czasowym  $\tau_{\text{ex}}$  podejmuje się próbę wymiany replik między parą okien o kolejnych numerach, na przykład między oknami 1-2, 3-4, 5-6, itd. Natomiast w kroku czasowym  $2\tau_{\text{ex}}$  podejmuje się próbę wymiany replik między oknami 2-3, 4-5, 6-7, itd.

### 3.6.2 Metadynamika

Innym podejściem do rozwiązania problemu próbkowania wzdłuż współrzędnej reakcji jest wykorzystanie metadynamiki. Ta metoda polega na przyłożeniu do współrzędnej reakcji  $\zeta$  zewnętrznego potencjału zależnego od czasu, który ma na celu zapobiegać “grzeźnięciu” układu w głębokich minimach lokalnych [143].

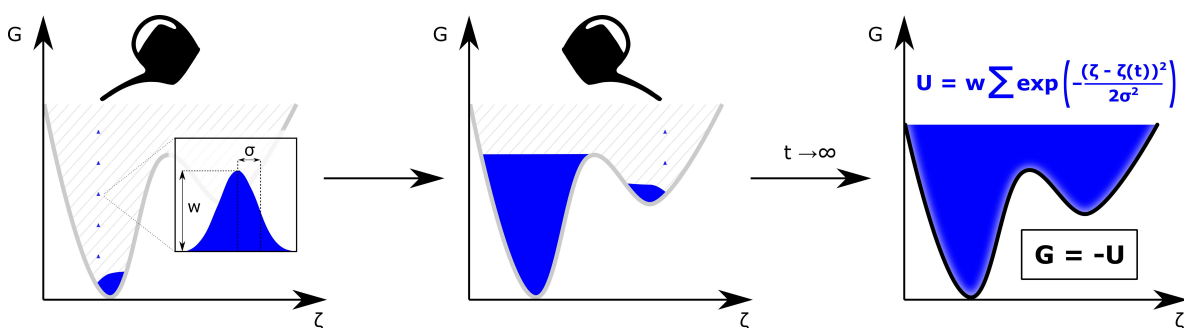
Technicznie, w metadynamice osiąga się to poprzez okresowe dodawanie do zewnętrznego potencjału niewielkich inkrementów w określonych odstępach czasu ( $t =$

$\tau_G, 2\tau_G, \dots$ ). Te inkreenty zazwyczaj przyjmują kształt gaussowski i są skupione wokół aktualnego położenia układu  $\zeta(t)$ :

$$u = w \exp \left[ -\frac{(\zeta - \zeta(t))^2}{2\sigma^2} \right], \quad (3.26)$$

gdzie  $w$  to wysokość inkreentu, a  $\sigma$  jego szerokość. W rezultacie na system, który znajduje się w lokalnym minimum, działa narastająca siła wypychająca go z tego minimum. Inkreenty z kolejnych kroków czasowych  $t$  są sumowane, tworząc potencjał o postaci:

$$U(\zeta, t) = w \sum_{t=\tau_G, 2\tau_G, \dots} \exp \left( -\frac{(\zeta - \zeta(t))^2}{2\sigma^2} \right). \quad (3.27)$$



Rys. 3.6: Wyznaczanie krzywej energii swobodnej przy pomocy metadynamiki. Lokalne minimum jest powoli wypełniane przez dodawane inkreenty (o kształcie krzywej Gaussa), dzięki czemu układ jest zmuszony do próbkowania innych położenia wzdłuż współrzędnej reakcji  $\zeta$ . Ostatecznie uzyskujemy potencjał, który równoważy krzywą energii swobodnej, dzięki czemu układ odwiedza wszystkie miejsca na  $\zeta$  z takim samym prawdopodobieństwem.

W trakcie symulacji układ stopniowo opuszcza lokalne minimum wzdłuż współrzędnej reakcji, co umożliwia mu przemieszczenie się do innych lokalnych minimów (jak to zostało schematycznie zilustrowane na Rys. 3.6). Zgodnie z tą konstrukcją, gdy  $t \rightarrow \infty$ , układ odwiedza wszystkie położenia na  $\zeta$  z równym prawdopodobieństwem, a szukany profil energii swobodnej  $G(\zeta)$  jest wówczas równy ujemnemu przyłożonemu potencjałowi:

$$G(\zeta) = -U(\zeta, t \rightarrow \infty). \quad (3.28)$$

Zaletą metadynamiki w stosunku do próbkowania parasolkowego jest fakt, że w typowych sytuacjach koszt obliczeniowy rośnie tu znacznie wolniej ze zwiększaniem wymiarowości współrzędnej reakcji. Jednak ze względu na dodawanie niewielkich inkrementów, próbkowanie obszaru  $\zeta$  może być czasochłonne. Aby przyspieszyć uzbieźnianie, prowadzi się zwykle równoległe  $N$  symulacji typu metadynamiki, inicjując je w różnych punktach  $\zeta$ , i pozwalając na współdzielenie przez nie informacji o dodanych inkrementach potencjału. Takie podejście w sposób trywialny przyspiesza  $N$ -krotnie próbkowanie  $\zeta$  [144].

W celu zapobieżenia oscylacji wyznaczanych profili opracowano wariant metadynamiki znany jako (ang.) *well-tempered* [145]. W tej odmianie kontroluje się wysokość





(w) dodawanego inkrementu, obniżając ją w czasie zgodnie z równaniem:

$$w(t) = \omega \exp\left(-\frac{U(\zeta, t)}{k_B \Delta T}\right), \quad (3.29)$$

gdzie  $\omega$  to początkowa wysokość inkrementu a  $\Delta T$  to parametr skalujący o wymiarze temperatury, który pozwala na łatwą kontrolę rozmiaru deponowanych inkrementów potencjału. W przypadku tej wersji metadynamiki, zależność między energią swobodną a całkowitym przykładowym potencjałem przedstawia się następująco:

$$U(\zeta) = -\frac{T + \Delta T}{\Delta T} U(\zeta, t \rightarrow \infty) = -\gamma U(\zeta, t \rightarrow \infty). \quad (3.30)$$

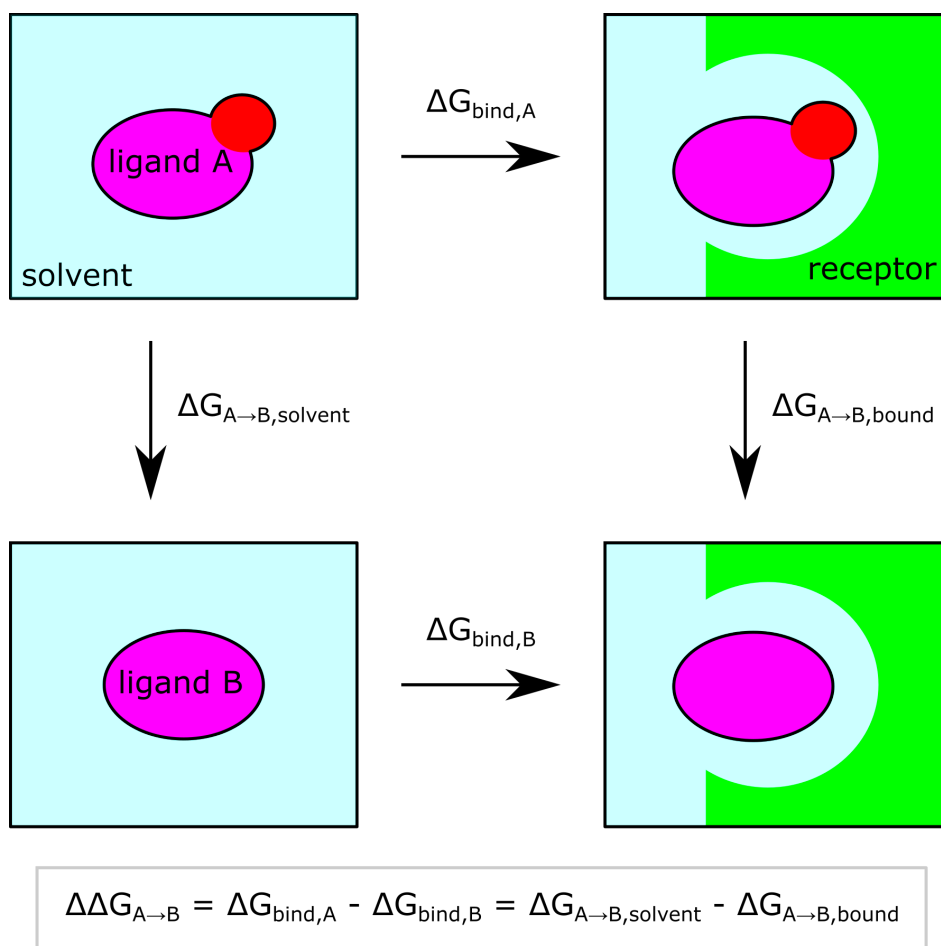
Gdy  $\Delta T \rightarrow 0$ , wielkość dodawanego inkrementu jest nieskończenie mała, co odpowiada symulacji równowagowej bez dodatkowego potencjału. Natomiast gdy  $\Delta T \rightarrow \infty$ , wielkość inkrementu jest stała, co sprowadza się do podstawowego wariantu metadynamiki. Dzięki takiemu podejściu można rozpocząć obliczenia z inkrementami o dużej wysokości, co umożliwi szybkie zlokalizowanie wszystkich potencjalnych minimów energetycznych. Następnie, poprzez zredukowanie inkrementów ( $w \rightarrow 0$ ), można zmniejszyć niepewność wyznaczanej energii swobodnej.

### 3.6.3 Techniki alchemiczne

W przypadku, gdy interesuje nas, w jaki sposób energia swobodna danego procesu, np. wiązania ligand—receptor, zmienia się w odpowiedzi na modyfikację struktury chemicznej liganda lub receptora (czyli  $\Delta\Delta G_{A \rightarrow B}$ ), często okazuje się, że nie ma konieczności prowadzenia kosztownych obliczeń absolutnych wartości  $\Delta G$  wiązania. W takich sytuacjach można bowiem skorzystać z cykli termodynamicznych w połączeniu z obliczeniami  $\Delta G$  dla fizycznie nieosiągalnych (“alchemicznych”) transformacji [146]. Przykładowy cykl termodynamiczny pozwalający na wyznaczenia  $\Delta\Delta G$  wiązania dwóch ligandów, obejmujący transformacje alchemiczne, przedstawiony jest na Rys. 3.7.

Do opisu transformacji układu ze stanu opisanego hamiltonianem A (np. zawierającego ligand A) do stanu opisanego hamiltonianem B (np. zawierającego ligand B) wykorzystuje się parametr  $\lambda$ , który określa postęp przemiany na drodze z A ( $\lambda = 0$ ) do B ( $\lambda = 1$ ). W praktyce, przy pomocy parametru  $\lambda$  kontroluje się zwykle oddziaływania niewiążące między wybraną cząsteczką lub jej częścią a resztą układu, skalując niezależnie wkłady dyspersyjne i elektrostatyczne. W ten sposób można na przykład w sposób niefizyczny wytworzyć lub anihilować całą cząsteczkę bądź jej fragment.

Podobnie jak w przypadku metody umbrella sampling, na ogół symulacje alchemiczne prowadzi się w kilku bądź kilkunastu równoległych symulacjach (“oknach”), z których każda odpowiada innej wartości  $\lambda$  z zakresu od 0 do 1. Do wyznaczenia różnicy energii swobodnej między stanami  $\lambda = 1$  a  $\lambda = 0$  wykorzystać można tzw. metodę BAR (ang. Bennett acceptance ratio) [147] lub całkowanie termodynamiczne [148]. W przypadku obliczeń z wyko-



**Rys. 3.7:** Cykl termodynamiczny pozwalający wyznaczyć zmianę energii swobodnej wiązania ligand–receptor w odpowiedzi na zmianę struktury chemicznej cząsteczki ( $\Delta\Delta G_{A\rightarrow B}$ ). Dzięki zastosowaniu podejścia alchemicznego, możliwe jest wyznaczenie zmian energii swobodnej towarzyszące transformacji liganda A w ligand B w stanie niezwiązanym ( $\Delta G_{A\rightarrow B,\text{solvent}}$ ) oraz związanym ( $\Delta G_{A\rightarrow B,\text{bound}}$ ). Z kolei względną zmianę energii swobodnej  $\Delta\Delta G_{A\rightarrow B}$  uzyskujemy poprzez odjęcie  $\Delta G_{A\rightarrow B,\text{bound}}$  od  $\Delta G_{A\rightarrow B,\text{solvent}}$ .

rzystaniem technik alchemicznych możliwa jest również wymiana replik między sąsiednimi oknami.

Poza badaniem wpływu różnic w strukturze ligandów na powinowactwo do danej makrocząsteczki, podejście alchemiczne bywa stosowane także do badania innych zagadnień, takich jak wpływ mutacji ma stabilność formy zwiniętej białka lub równowagę konformacyjną, różnice w energetyce solwatacji oraz współczynnik podziału danej cząsteczki pomiędzy różne fazy [149]. W przeciwieństwie do metody US, podejście alchemiczne dostarcza wyłącznie informacji o różnicy energii swobodnej pomiędzy zdefiniowanymi stanami końcowym i początkowym. Nie jest zatem w tej metodzie możliwe scharakteryzowanie stanu przejściowego (np. na granicy faz w trakcie transportu cząsteczki). Warto jednak zauważyć, że dzięki podejściu alchemicznemu możemy często uniknąć problemów z próbkowaniem, wynikających z występowania barier energetycznych wzdłuż współrzędnej reakcji opisującej proces.

### 3.7 Zastosowane protokoły symulacyjne

Większość symulacji przeprowadziłem, korzystając z pakietu Gromacs (w wersji 2018 lub nowszej) [150]. Symulacje dotyczące reorientacji izomerów zeaksantyny wykonałem przy użyciu pakietu NAMD [151]. Układy błonowe skonstruowałem przy użyciu narzędzi Charmm-Gui Membrane Builder [152] i MemGen [153]. W większości przypadków do opisu oddziaływań między białkami lub lipidami użyłem pola siłowego CHARMM36m [154], natomiast w symulacjach dotyczących wiązania cholesterolu do peptydów L11 i KALP21 zastosowałem pole siłowe Amber99SB-ildn dla peptydów [155] oraz Slipids dla lipidów [156–158]. Wszystkie symulacje przeprowadziłem z zastosowaniem modelu wody TIP3P [159].

W symulacjach prowadzonych przy użyciu pakietu Gromacs zastosowałem termostat Nosé-Hoovera [137, 138], a ciśnienie utrzymywałem semi-izotropowo (oddzielnie dla płaszczyzny XY i osi Z) na poziomie 1 bar przy użyciu barostatu Parrinello-Rahmana [139]. W symulacjach przy użyciu pakietu NAMD kontrolę temperatury zapewniłem poprzez zastosowanie dynamiki Langevina [160], a ciśnienie utrzymywałem przy użyciu metody tłoka Langevina [161]. We wszystkich symulacjach zastosowałem periodyczne warunki brzegowe (we wszystkich trzech współrzędnych kartezjańskich). Oddziaływania elektrostatyczne były obliczane przy użyciu algorytmu SPME [162] z promieniem odcięcia 1.2 nm (dla pola siłowego CHARMM36m) lub 1.4 nm (dla pola siłowego Amber/Slipids). Oddziaływania dyspersyjne były obliczane z promieniem odcięcia 1.2 nm (dla pola siłowego CHARMM36m) bądź 1.4 nm (dla pola siłowego Amber/Slipids). Dodatkowo, w symulacjach z polem siłowym CHARMM36m zastosowałem promień wyłączenia  $r_{\text{switch}} = 1.0$  nm. Długość wiązania z udziałem atomów wodoru była w trakcie symulacji usztywniona przy użyciu algorytmu P-Lincs [163]. Do rozwiązania równań ruchu użyłem algorytmu Verleta w wariancie “zabiego skoku” z krokiem czasowym 2 fs.

Do badania zaprojektowanych przeze mnie procesów, wykorzystałem wtyczkę Plumed [164] w trakcie symulacji. Dzięki tej wtyczce możliwe było przykładanie do układu zewnętrznego potencjału, co pozwoliło na utrzymanie stałej odległości między pewnymi cząsteczkami (m.in. w symulacjach typu umbrella sampling), nakładanie dodatkowych więzów na ruch cząsteczek tam, gdzie było to niezbędne, a także realizację symulacji typu metadynamiki.

W symulacjach z wykorzystaniem techniki umbrella sampling, profile energii swobodnej wyznaczyłem przy użyciu metody ważonych histogramów (WHAM) [141], a niepewności obliczyłem za pomocą metody (ang.) bootstrap opartej na podejściu Monte Carlo z uwzględnieniem czasów autokorelacji w szeregach czasowych [165]. W przypadku symulacji typu metadynamiki zastosowałem blokowe uśrednianie profili energii swobodnej. W przypadku obliczeń alchemicznych energie swobodne i ich niepewności uzyskałem za pomocą metody Bennet Acceptance Ratio [147] zaimplementowanej w programie gmx bar.



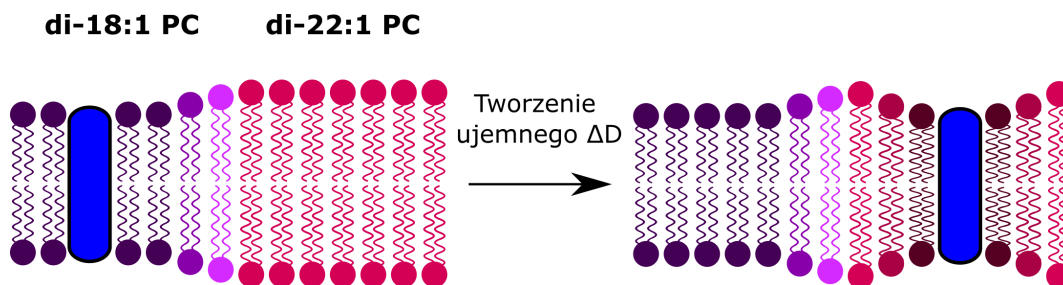
Analizy wygenerowanych trajektorii dynamicznych przeprowadziłem przy użyciu narzędzi pakietu Gromacs, g\_lomepro [166] lub własnych skryptów w języku Python [167]. Wizualizacje wykonałem przy użyciu oprogramowania VMD [168].

### 3.7.1 Symulacje z wykorzystaniem modelu inkluzji transbłonowej

W symulacjach wykorzystałem układy zawierające inkluzje o zróżnicowanej długości hydrofobowej, osadzone w modelowych błonach lipidowych. Aby uzyskać błonę o wysokim stopniu uporządkowania, skonstruowałem układ zawierający 240 cząsteczek DMPC (di-14:0 PC) oraz 104 cząsteczki cholesterolu (DMPC/CHL), aby uzyskać stosunek molowy DMPC do cholesterolu wynoszący 7:3. Wykorzystałem trzy różne błony o niskim stopniu uporządkowania zawierające 280 cząsteczek nienasyconych lipidów o różnej długości łańcuchów acylowych: DOPC (di-16:1 PC), DEiPC (di-18:1 PC) lub DEPC (di-20:1 PC). Błony solwatowałem wodą, tworząc prostopadłościenne pudło (o długości ok. 9 nm wzdłuż każdej współrzędnej kartezjańskiej), z dodatkiem jonów  $K^+$  i  $Cl^-$ , aby utrzymać siłę jonową na poziomie fizjologicznym (0.15 M). Przygotowane układy zawierały około 70 000 atomów i zostały poddawane wstępnym etapom równoważenia zgodnie z protokołem Charmm-Gui Membrane Builder. Symulacje przeprowadziłem w temperaturze 320 K.

#### Molekularne podłoże niedopasowania hydrofobowego

Do zbadania molekularnego podłoża niedopasowania hydrofobowego, użyłem układu, w którym znajdowały się dwie domeny nieuporządkowane ( $L_D$ ) o różnej grubości, między którymi nie dochodziło do mieszania się lipidów (zgodnie z Rys. 3.8). Do zbudowania takiego układu, wykorzystałem wcześniej przygotowane układy zawierające odpowiednio lipidy DOPC oraz DEPC, które umieściłem obok siebie za pomocą programu gmx editconf. Aby zapobiec wymieszaniu się lipidów, zastosowałem potencjał działający na grupy fosforanowe lipidów DEPC, który uniemożliwił ich dyfundowanie przez granicę faz do obszaru, w którym znajdowały się lipidy DOPC.



Rys. 3.8: Schematyczne zobrazowanie procesu tworzenia ujemnego niedopasowania hydrofobowego poprzez przeniesienie modelowej inkluzji z domeny zawierającej lipidy DOPC, gdzie  $\Delta D = 0$  nm do obszaru lipidów DEPC, w której  $\Delta D < -0.8$  nm. Zastosowanie potencjału działającego na grupy fosforanowe lipidów DEPC uniemożliwia ich dyfuzję przez granicę faz do drugiej domeny, dzięki czemu skład domen pozostawał stały w trakcie symulacji.

Aby obliczyć zmianę energii swobodnej związanej z przeniesieniem inkluzji z domeny zawierającej lipidy DOPC ( $L_D$ ), w której  $\Delta D = 0$  do domeny zawierającej lipidy DEPC

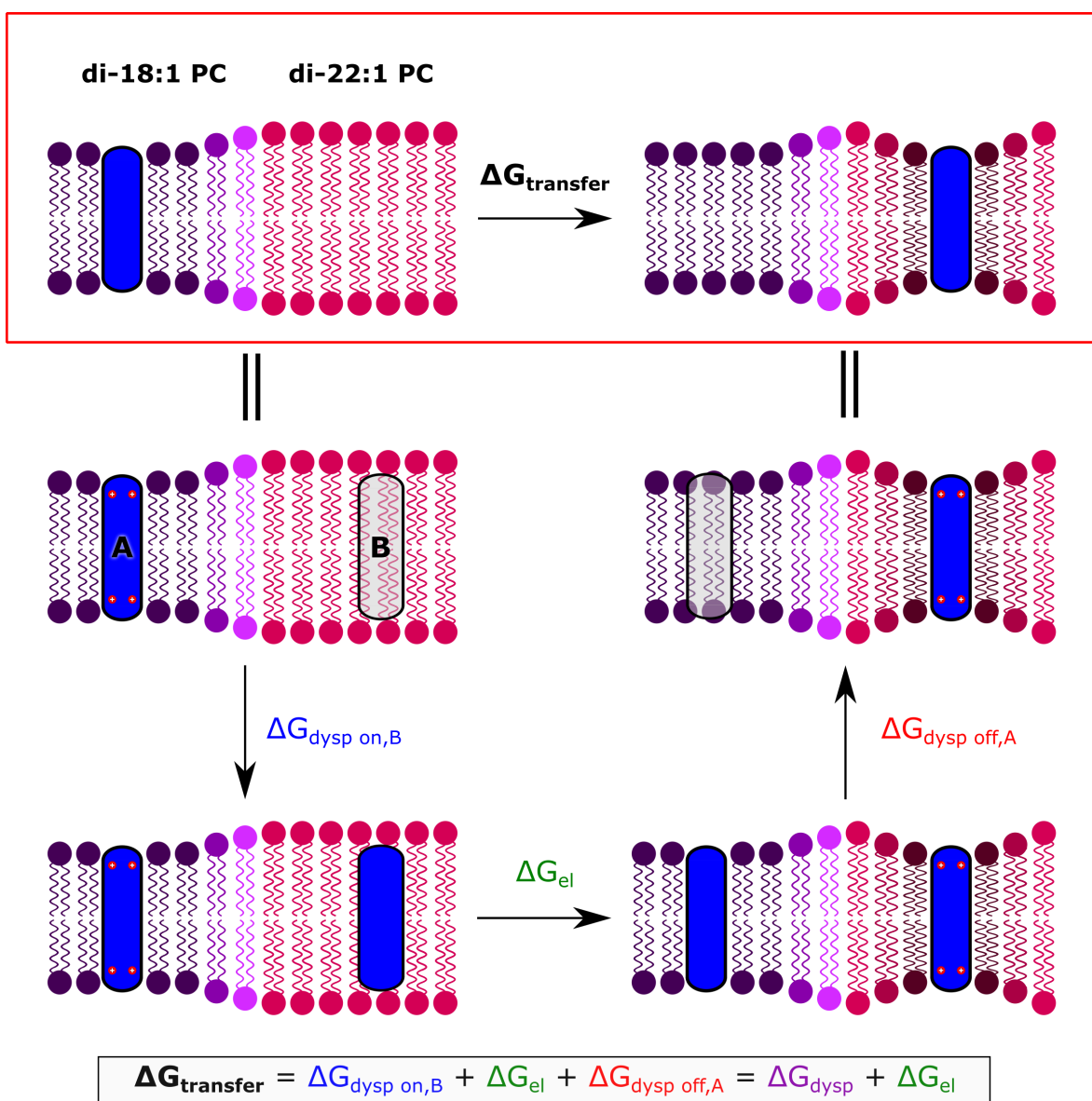
(również  $L_D$ ), w której  $\Delta D = -0.8$  nm, skonstruowałem cykl termodynamiczny przedstawiony na Rys. 3.12. Zgodnie z tym schematem, wyznaczyłem wartość  $\Delta G_{\text{transfer}}$  jako sumę trzech wkładów do energii swobodnej: i)  $\Delta G_{\text{dysp on,B}}$ , ii)  $\Delta G_{\text{el}}$  oraz iii)  $\Delta G_{\text{dysp off,A}}$ . Każdy z tych trzech wkładów do energii swobodnej obliczyłem na podstawie niezależnych symulacji, w których parametr  $\lambda$  kontrolował udział oddziaływań:

1. dyspersyjnych w inkluzji “B”, gdzie  $\lambda = 0$  oznaczał ich brak, a  $\lambda = 1$  oznaczał pełne oddziaływania dyspersyjne dla inkluzji “B”,
2. elektrostatycznych w obu inkluzjach, gdzie  $\lambda = 0$  oznaczał pełne oddziaływania elektrostatyczne dla inkluzji “A” i ich brak dla inkluzji “B”, natomiast  $\lambda = 1$  oznaczał sytuację odwrotną,
3. dyspersyjnych w inkluzji “A”, gdzie  $\lambda = 0$  oznaczał pełne oddziaływania dyspersyjne dla tej inkluzji, a  $\lambda = 1$  oznaczał ich brak.

Dla każdego z trzech etapów obliczenia prowadziłem z wykorzystaniem 24 niezależnych “okien” symulacyjnych o różnych wartościach parametru  $\lambda$  w zakresie 0 do 1, dobranych w taki sposób, aby zapewnić efektywne próbkowanie. Dodatkowo, w celu zapewnienia stabilności numerycznej obliczeń w obszarach, gdzie występuje zanik lub pojawienie się oddziaływań dyspersyjnych lub elektrostatycznych, zastosowałem tzw. “miękkie potencjały” (ang. soft-core potential) [169]. Zastosowałem następujące wartości parametrów w równaniu Beutlera [170] opisującego oddziaływanie międzyatomowe przy zastosowaniu miękkich potencjałów:  $\alpha_{\text{sc}} = 0.5$ ,  $\sigma_{\text{sc}} = 0.3$  nm, oraz wykładnik  $s_{\text{sc}} = 1$ .

#### **Wpływ niedopasowania hydrofobowego na dimeryzację inkluzji błonowych**

W celu zbadania procesu dimeryzacji inkluzji w błonach DMPC/CHL i DOPC, zastosowałem metodę umbrella sampling (US). W symulacjach US jako współrzędną reakcji wykorzystałem odległość między środkami mas hydrofobowych fragmentów inkluzji, rzutowaną na płaszczyznę błony (XY-odległość). Do próbkowania współrzędnej reakcji zastosowałem równomiernie rozmieszczone “okna” US (co 0.3 nm), obejmujące zakres od 0.7 do 4.0 nm. Z kolei dla inkluzji, dla których wartość  $\Delta D = -0.6$  nm maksymalny zakres współrzędnej reakcji zwiększyłem do 4.3 nm. W każdym oknie zastosowałem potencjał harmoniczny (o stałej siłowej  $k = 59.8$  kcal/(mol · nm<sup>2</sup>)), który utrzymywał zadaną XY-odległość między inkluzjami. Dodatkowo, dla części układów dodałem okno w położeniu 1.05 nm, dla którego ze względu na występującą barierę energetyczną zastosowałem potencjał o większej stałej siłowej ( $k = 239.0$  kcal/(mol · nm<sup>2</sup>)). W celu przygotowania początkowego zestawu konfiguracji dla okien US przeprowadziłem krótką symulację typu sterowanej dynamiki molekularnej. W trakcie tej symulacji inkluzje, które początkowo znajdowały się w stanie dimerycznym, były stopniowo rozsuwane od siebie przez 100 ns, osiągając odległość 4.0 nm (lub 4.3 nm w przypadku inkluzji, dla których  $\Delta D = -0.6$  nm). Dodatkowo, do zbadania



Rys. 3.9: Cykl termodynamiczny służący do wyznaczenia zmiany energii swobodnej towarzyszącej utworzeniu ujemnego niedopasowania hydrofobowego poprzez przeniesienie modelowej inkluzji z domeny zawierającej lipidy DOPC, gdzie  $\Delta D = 0$  nm do obszaru lipidów DEPC, w której  $\Delta D < -0.8$  nm.

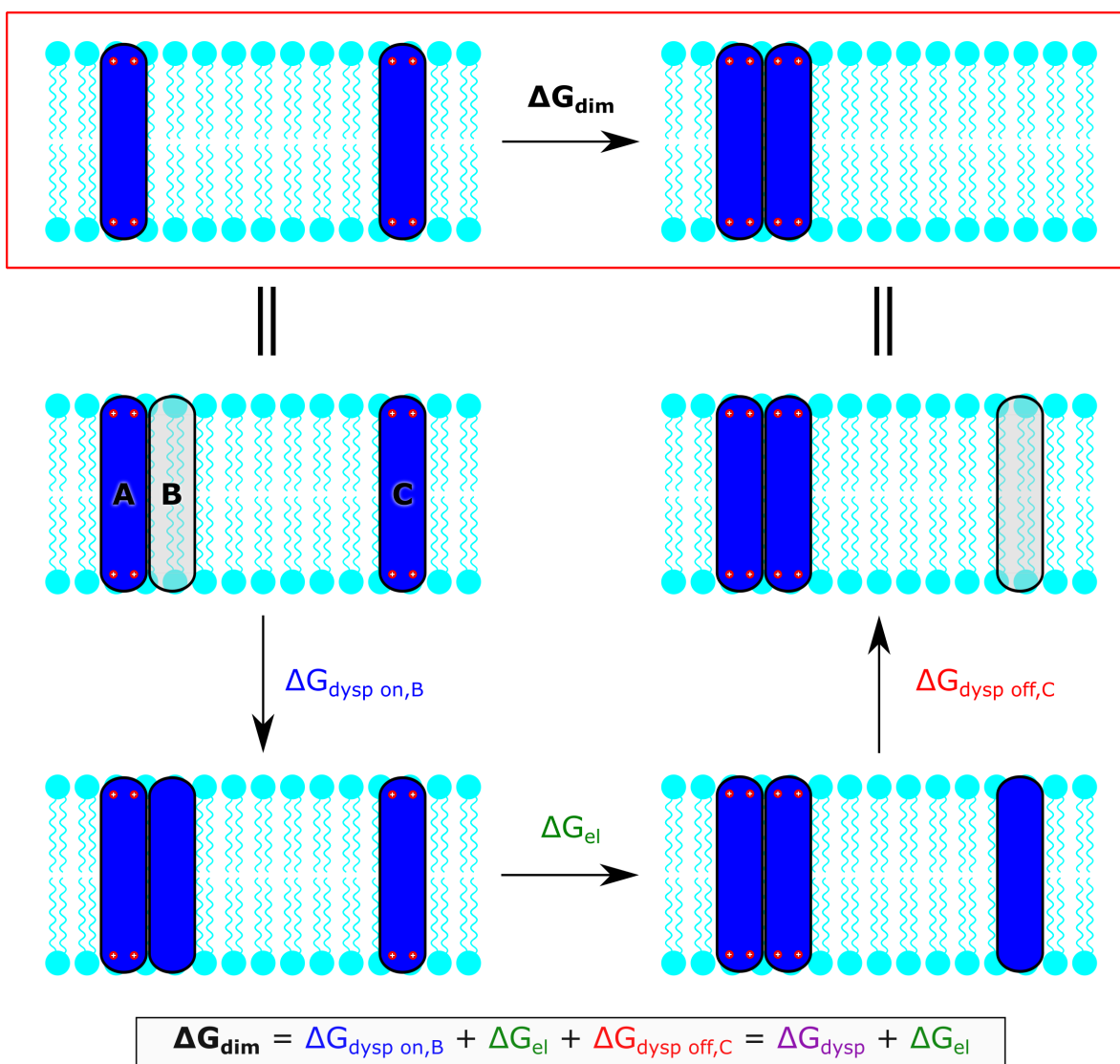
procesu dimeryzacji inkluzji pozbawionych ładunku elektrycznego, zastosowałem potencjał harmoniczny (o stałej siłowej  $k = 119.5$  kcal/(mol · nm<sup>2</sup>)) usztywniający orientację inkluzji prostopadle do powierzchni błony. Aby przyspieszyć próbkowanie przestrzeni konfiguracyjnej, zastosowałem wymianę konfiguracji pomiędzy sąsiadującymi oknami, gdzie akceptacja wymiany odbywała się zgodnie z kryterium Metropolis [171]. Próby wymiany konfiguracji podejmowane były z częstotliwością 1 ns.

Zmianę energii swobodnej towarzyszącą dimeryzacji inkluzji w błonie DMPC/CHL wyznaczyłem także z zastosowaniem podejścia alchemicznego. Aby obliczyć tę zmianę, skonstruowałem cykl termodynamiczny pokazany na Rys. 3.10. Zgodnie z tym schematem, wyznaczyłem wartość  $\Delta G_{\text{dim}}$  jako sumę trzech wkładów do energii swobodnej: i)  $\Delta G_{\text{dysp on,B}}$ , ii)  $\Delta G_{\text{el}}$  oraz iii)  $\Delta G_{\text{dysp off,C}}$ . Każdy z tych trzech wkładów do energii swo-



bodnej obliczyłem na podstawie niezależnych symulacji, w których parametr  $\lambda$  kontrolował udział oddziaływań:

1. dyspersyjnych w inkluzji “B”, gdzie  $\lambda = 0$  oznaczał ich brak, a  $\lambda = 1$  oznaczał pełne oddziaływania dyspersyjne dla tej inkluzji,
2. elektrostatycznych w inkluzjach “B” i “C”, gdzie  $\lambda = 0$  oznaczał pełne oddziaływania elektrostatyczne dla inkluzji “C” i ich brak dla inkluzji “B”, natomiast  $\lambda = 1$  oznaczał sytuację odwrotną,
3. dyspersyjnych w inkluzji “C”, gdzie  $\lambda = 0$  oznaczał pełne oddziaływania dyspersyjne dla tej inkluzji, a  $\lambda = 1$  oznaczał ich brak.



Rys. 3.10: Cykl termodynamiczny umożliwiający wyznaczenie zmiany energii swobodnej towarzyszącej dimeryzacji inkluzji w podejściu alchemicznym.

Podobnie jak dla obliczeń dotyczących tworzenia ujemnego niedopasowania hydrofobowego, w celu uzyskania każdego z trzech wkładów do energii swobodnej, przeprowa-

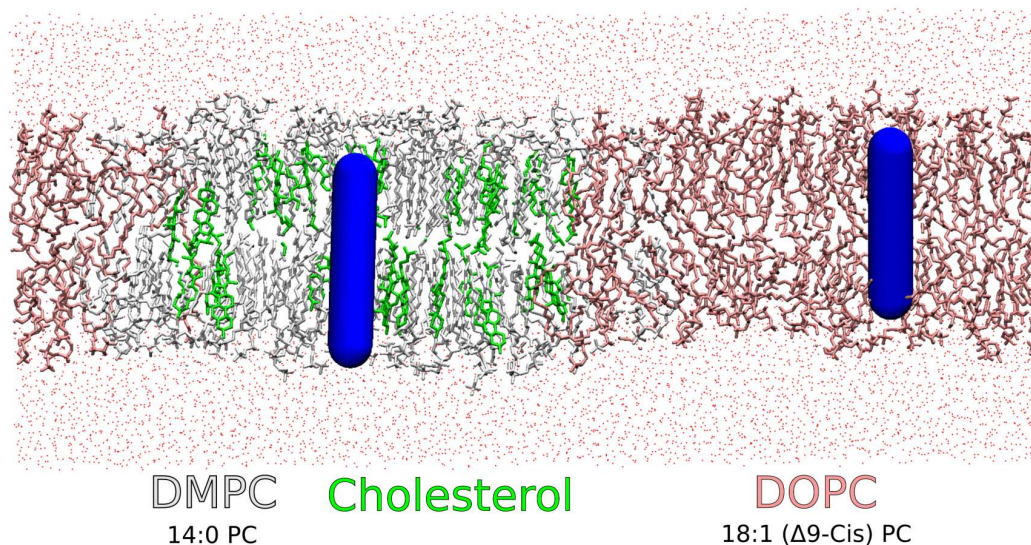


dziłem symulację w 24 “oknach”, w których wartość parametru  $\lambda$  zmieniała się od 0 do 1 w sposób nierównomierny, tak by zoptymalizować efektywność próbkowania. Zastosowałem również miękkie potencjały, dla których, podobnie jak wcześniej, dobrałem następujące parametry:  $\alpha_{sc} = 0.5$ ,  $\sigma_{sc} = 0.3$  nm, oraz wykładnik  $s_{sc} = 1$ . Ponadto, aby zapewnić trwałość stanu dimerycznego w trakcie symulacji odległość między inkluzjami A i B (Rys. 3.10) była utrzymywana poniżej wartości 0.8 nm przy pomocy dodatkowego potencjału o stałej siłowej  $k = 119.5$  kcal/(mol · nm<sup>2</sup>).

### Niedopasowanie hydrofobowe a segregacja inkluzji między domenami o różnym stopniu uporządkowania

Aby zbadać rolę niedopasowania hydrofobowego w segregacji inkluzji między domenami o różnym stopniu uporządkowania, stworzyłem układy symulacyjne zawierające dwie domeny błonowe o różnym stopniu uporządkowania (zgodnie z Rys. 3.11). W tym celu wykorzystałem wcześniej przygotowane układy: DMPC/CHL, reprezentujący domenę L<sub>O</sub> oraz jeden z układów – DOPC, DEiPC lub DEPC, reprezentujący domenę L<sub>D</sub>. Układy te umieściłem obok siebie za pomocą programu gmx editconf. Podobnie jak w przypadku obliczeń dotyczących tworzenia niedopasowania hydrofobowego, zastosowałem potencjał działający na grupy fosforanowe lipidów DMPC, który uniemożliwił ich dyfundowanie przez granicę faz do domeny L<sub>D</sub>, tak by zachować niezmienny skład domen w trakcie symulacji.

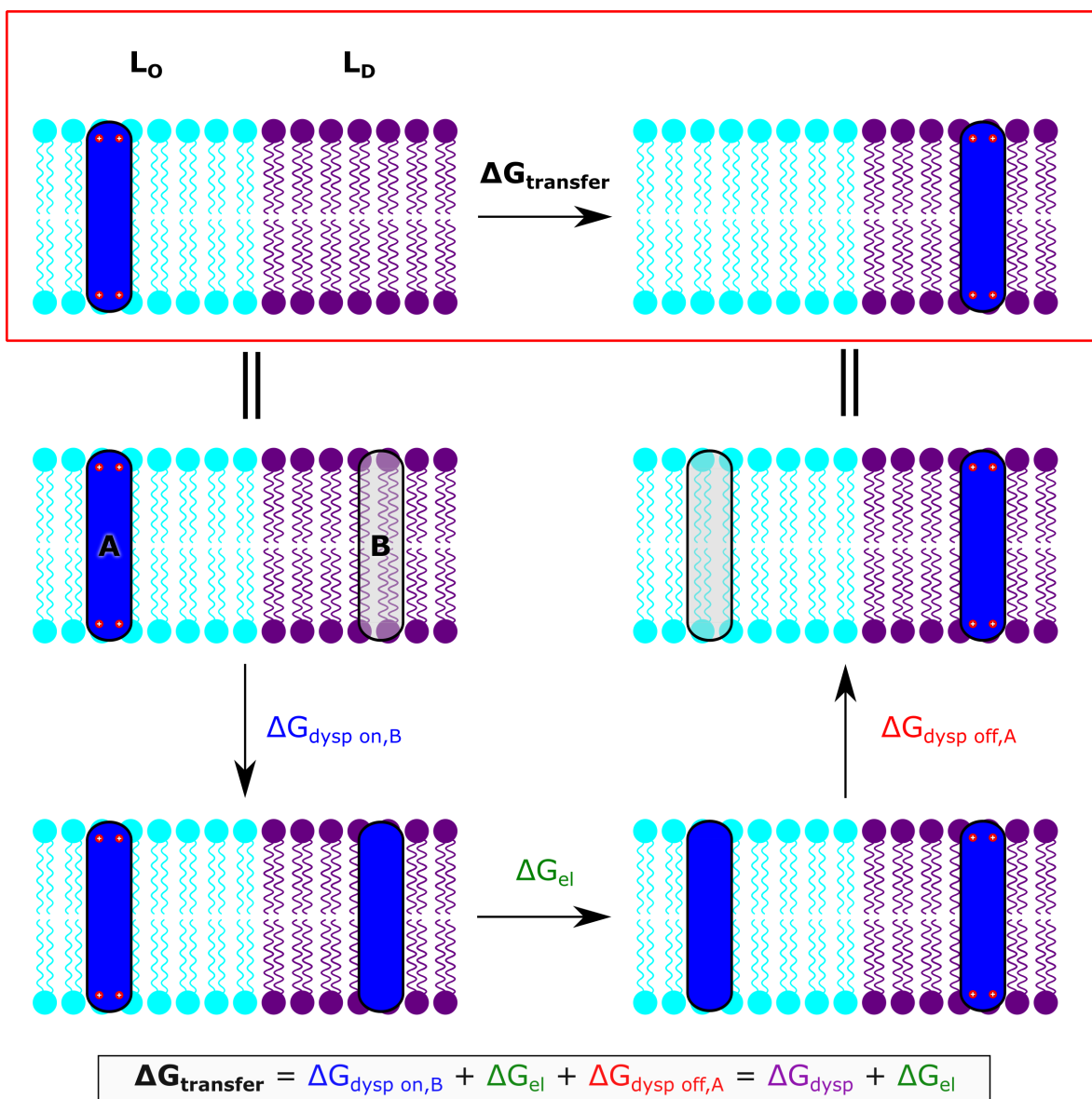
W obrębie każdej z dwóch domen umieściłem pojedynczą “cząsteczkę” inkluzji, a ich położenia w domenie były kontrolowane za pomocą dodatkowego potencjału. Stworzyłem trzy różne układy, w których umieściłem inkluzje modelowe o różnej długości, aby zbadać proces segregacji inkluzji między domenami błonowymi w zależności od wartości niedopasowania hydrofobowego  $\Delta D$ . W przypadku domeny L<sub>O</sub>, wartość  $\Delta D$  przyjmowała następujące wartości: i) -0.6 nm, ii) 0 nm oraz iii) 0.4 nm.



**Rys. 3.11:** Układ symulacyjny zawierający modelowe inkluzje osadzone w błonie złożonej z dwóch różnych domen lipidowych – uporządkowanej, zbudowanej z DMPC i cholesterolu oraz nieuporządkowanej, zbudowanej z DOPC.

W analogiczny sposób przygotowałem układy zawierające niemieszające się domeny DMPC/CHL ( $L_O$ ) oraz DOPC ( $L_D$ ), gdzie zamiast inkluzji znajdowały się biologicznie aktywne cząsteczki: zeaksantyny (Zea), astaksantyny (Asta), peptydy WALP lub KALP.

Do wyznaczenia zmiany energii swobodnej towarzyszącej przeniesieniu inkluzji z domeny uporządkowanej (zawierającej lipidy DMPC i cholesterol) do nieuporządkowanej (zawierającej lipidy DOPC, DEiPC lub DEPC) zastosowałem protokół analogiczny do użytego w obliczeniach energii swobodnej tworzenia niedopasowania hydrofobowego (patrz: podrozdział 3.7.1). Do obliczeń wykorzystałem zarówno modelowe inkluzje o różnych długościach hydrofobowych, jak i wybrane związki czynne biologicznie: zeaksantynę (Zea), astaksantynę (Asta) oraz peptydy WALP i KALP.



Rys. 3.12: Cykl termodynamiczny służący do wyznaczenia zmian energii swobodnej towarzyszącej przeniesieniu inkluzji z fazy uporządkowanej  $L_O$  do nieuporządkowanej  $L_D$ .

### 3.7.2 Specyficzne wiązanie cholesterolu do peptydów transbłonowych

Układy symulacyjne zostały wcześniej przygotowane przez zespół profesora H.J. Riselady. Każdy z układów składał się z peptydu (L11 lub KALP21) osadzonego w błonie lipidowej złożonej z 90 cząsteczek POPC (16:0-16:1 PC) i 38 cząsteczek cholesterolu (stężenie ok. 30% mol). Błony solwato wałem wodą, aby uzyskać pudła symulacyjne o wymiarach 5.6 x 5.6 x 10 nm, w których mieściło się około 35 000 atomów. Symulacje przeprowadziłem w temperaturze 303.15 K.

Po przeprowadzeniu krótkiej symulacji równowagowej dla każdego systemu, wyznaczyłem profil energii swobodnej w zależności od odległości między cholesterolu a peptydem, korzystając z techniki umbrella sampling. Konkretniej, jako współrzędną reakcji wybrałem XY-odległość między środkiem masy pierścieni steranu wybranego cholesterolu a środkiem masy atomów węgla  $C_{\alpha}$  reszt 1-12 (L11) lub 1-11 (KALP21), stanowiących połowę helisy każdego z peptydów. Aby uzyskać precyzyjną krzywą energii swobodnej, próbkowałem współrzędną reakcji w zakresie od 0.7 do 2.3 nm, używając 9 równo rozmieszczonych "okien" symulacyjnych oddzielonych od siebie o 0.2 nm. Do przygotowania początkowego zestawu konfiguracji w oknach US, przeprowadziłem krótką symulacji typu sterowanej dynamiki molekularnej. W trakcie tej symulacji cholesterol, który początkowo znajdował się w odległości ok. 0.7 nm od każdego z peptydów, L11 bądź KALP21, były stopniowo rozsuwane od siebie przez 100 ns, osiągając odległość 2.3 nm. W każdym oknie zastosowałem potencjał harmoniczny o stałej siłowej  $k = 59.8 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{nm}^2)$ , który utrzymywał zadaną wartość współrzędnej reakcji. Dla każdego okna symulacyjnego przeprowadziłem obliczenia, aby uzyskać trajektorie o czasie 1.5  $\mu\text{s}$  każda.

### 3.7.3 Wiązanie białka prekursorowego amyloidu do $\gamma$ -sekreazy

Symulacje wiązania białka prekursorowego amyloidu (APP) do  $\gamma$ -sekreazy zostały przeprowadzone przez dr. Łukasza Nierzwickiego [76]. Pierwsze dwa układy zawierały fragment błonowy kompleksu  $\gamma$ -sekreazy pochodzący ze struktury krystalicznej pełnego enzymu (PDB ID 5FN2) [172]). Białko zostało osadzone w błonie lipidowej składającej się z 240 cząsteczek DPPC (di-16:0 PC) i 160 cząsteczek cholesterolu (DPPC/Chl) lub wyłącznie z 370 cząsteczek DPPC. Błony były solwutowane cząsteczkami wody, aby uzyskać pudła o rozmiarach około  $10.5 \times 10.5 \times 19 \text{ nm}$ . Dodatkowo symulowane były także układy zawierające izolowany peptyd APP (PDB ID 2LP1 [173]) osadzony w błonie zawierającej 108 cząsteczek lipidów DPPC i 72 cząsteczki cholesterolu (DPPC/Chl) lub wyłącznie 150 cząsteczek DPPC.

Moim zadaniem było przeprowadzenie analiz trajektorii uzyskanych z w/w symulacji równowagowych lub symulacji z wykorzystaniem metody US, gdzie współrzędną reakcji była XY-odległość między helisą APP a miejscem wiążącym w pobliżu helis TM6 i TM9 preseniliny. W tych systemach, każde z okien symulowano do uzyskania trajektorii o długości 1  $\mu\text{s}$ .

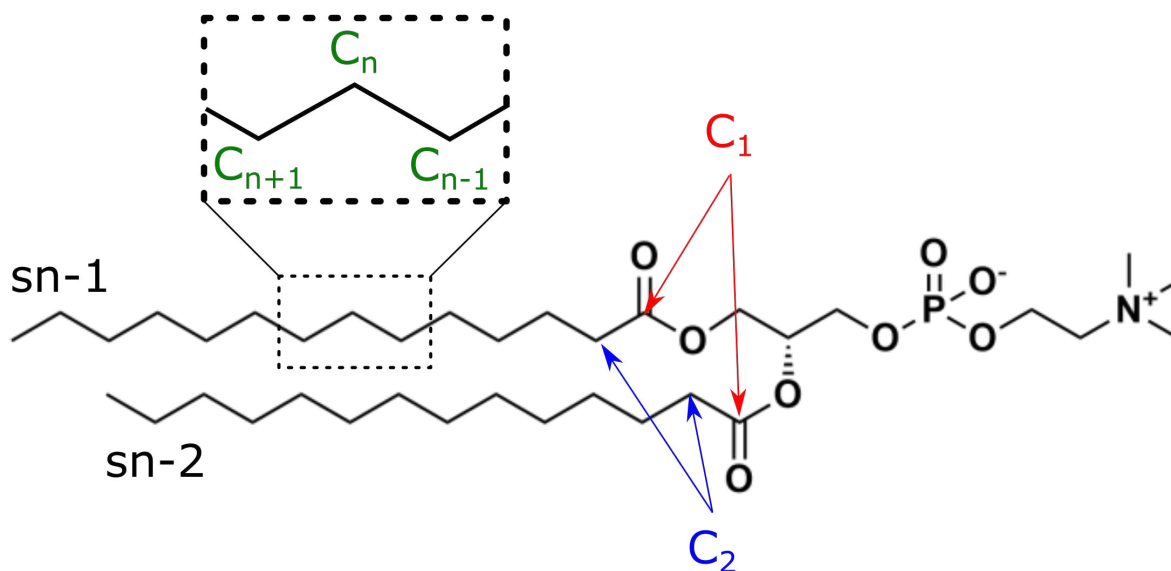


W ramach przeprowadzonych analiz wyznaczyłem dwuwymiarowe mapy grubości błony w układach zawierających  $\gamma$ -sekreazę i/lub APP za pomocą programu g\_lomepro [166]. Grubość błony zdefiniowałem jako średnią odległość pomiędzy atomami fosforu z obu listków błony. Dodatkowo wyznaczyłem także powierzchnię błony zajmowaną przez białka, wykorzystując do tego program gmx densmap [174].

Dla oceny wpływu białek na uporządkowanie łańcuchów acylowych lipidów, obliczyłem wartość współczynników uporządkowania  $S_{CD}$  w sąsiedztwie miejsca katalitycznego  $\gamma$ -sekreazy oraz w sąsiedztwie APP a także dla błony niezaburzonej. Do wyznaczenia zależności  $S_{CD}$  od numeru atomu węgla w łańcuchu acylowym posłużyłem się następującym równaniem (patrz też Rys. 3.13):

$$S_{CD,n} = \langle 3 \cos^2(\varphi) - 1 \rangle / 2, \quad (3.31)$$

gdzie  $\varphi$  to kąt pomiędzy wektorem zdefiniowanym przez wiązanie C–H n-tego atomu węgla w łańcuchu acylowym a osią prostopadłą do powierzchni błony. Wartości  $S_{CD}$  zostały uśrednione po wszystkich 'n'-tych atomach węgla, łańcuchach sn-1 i sn-2 oraz wszystkich cząsteczkach lipidów.



**Rys. 3.13:** Struktura cząsteczki lipidu DMPC. Atomy węgla w łańcuchach sn-1 oraz sn-2 są ponumerowane od '1' począwszy od węgla karboksylowego. Do obliczenia współczynnika  $S_{CD}$  zgodnie z równaniem 3.31, należy wyznaczyć kąt między wektorem definiowanym przez wiązanie C–H n-tego atomu węgla. Ze względu na obecność dwóch atomów wodoru przy atomie  $C_n$ , dla uproszczenia wektor równoległy do wiązania C–H wyznacza się, korzystając z położenia atomów  $C_{n-1}$  oraz  $C_{n+1}$ .

Do wyznaczenia współczynników  $S_{CD}$  w błonie niezaburzonej posłużyłem się programem g\_lomepro. W przypadku lipidów w sąsiedztwie substratów, skorzystałem z wcześniej przygotowanego skryptu w języku TCL, który umożliwił obliczenie współczynników  $S_{CD}$  lipidów, których środki mas znajdowały się w XY-odległości mniejszej niż 1.6 nm od  $\gamma$ -sekreazy lub APP.



Trajektorie układów APP/ $\gamma$ -sekretyazy analizowałem także poprzez wyznaczenie obwodów obszarów zaburzenia błony przez obecność inkluzji. Obszar zaburzenia błony zdefiniowałem jako obszar, w których lokalna grubość błony była o 0.15 nm mniejsza niż średnia grubość błony niezaburzonej obecnością białka. W założonym celu stworzyłem skrypt w języku Python umożliwiający detekcję konturów na obrazach z wykorzystaniem biblioteki OpenCV [175]. Wyzaczyłem obszary zaburzenia błony dla systemów zawierających: i) tylko  $\gamma$ -sekretyzę, ii) wyłącznie APP (jako przypadek, gdy  $\zeta \rightarrow \infty$ ) oraz iii) dla obszaru wiązania się APP do  $\gamma$ -sekretyazy bądź stanu pośredniego ( $\zeta = 1.1$  oraz  $1.6$  nm). Zmianę obwodu zaburzenia  $\Delta p$  obliczyłem poprzez odjęcie następujących składowych:

$$\Delta p = p_{(\gamma+APP),\zeta} - (p_{\gamma,\zeta \rightarrow \infty} + p_{APP,\zeta \rightarrow \infty}). \quad (3.32)$$

Na koniec oszacowałem wkład niedopasowania hydrofobowego  $\Delta D$  do zmiany energii swobodnej towarzyszącej asocjacji APP do  $\gamma$ -sekretyazy, korzystając z następującego wzoru (3.33:

$$\Delta G_{\Delta D} = \Delta p \cdot \sigma, \quad (3.33)$$

gdzie  $\sigma$  jest eksperymentalną wielkością napięcia liniowego i wynosi około 1–3 pN [176].

### 3.7.4 Agregacja koniugatów peptyd-antybiotyk w obrębie błon lipidowych

Struktury lewofloksacyny (LVX) oraz koniugatu z peptydem TP10 (TP10–NH<sub>2</sub>–LVX) zostały przygotowane i sparametryzowane (w polu siłowym CHARMM36m) przez dr. Miłosza Wieczora. Biorąc pod uwagę właściwości kwasowo-zasadowe LVX ( $pK_1 = 6.02$  oraz  $pK_2 = 8.12$ ), w badaniach wykorzystaliśmy wariant elektrycznie obojętny cząsteczki antybiotyku, co odpowiada warunkom przy pH = 7. Przygotowane przeze mnie układy zawierały pojedynczą cząsteczkę koniugatu, osadzoną w błonie lipidowej składającej się z 232 cząsteczek POPC (16:0-16:1 PC). Błone solwatowałem wodą i jonami K<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup> (siła jonowa 0.15 M), w celu uzyskania pudła symulacyjnego o rozmiarach około  $9 \times 9 \times 10$  nm. Tak zbudowany układ zawierał około 80 000 atomów. Symulacje przeprowadziłem w temperaturze 310 K.

Po przeprowadzeniu krótkiej symulacji równowagowej (około 100 ns), przystąpiłem do obliczeń mających na celu zbadanie energetyki wnikania koniugatu z fazy wodnej do wnętrza błony. Wykorzystałem dwuwymiarową metadynamikę, gdzie współrzędna  $\zeta_1$  reprezentowała odległość między środkiem masy LVX a środkiem błony, rzutowaną na oś prostopadłą do płaszczyzny błony (Z-odległość), natomiast współrzędna  $\zeta_2$  była Z-odległością między środkiem masy TP10 a środkiem błony. Dla usprawnienia obliczeń przygotowałem 12 “okien” symulacyjnych zainicjowanych w różnych położeniach wzdłuż współrzędnych reakcji. Dodatkowo zastosowałem skalowanie wielkości dodawanego inkrementu w czasie (tzw. wariant (ang.) *well-tempered* metadynamiki). Dla każdego okna przeprowadziłem symulacje o długości 400 ns, co pozwoliło uzyskać trajektorie o sumarycznej długości około 5  $\mu$ s.

Do zbadania stabilności porów wodnych zbudowanych z tetrameru TP–NH<sub>2</sub>–LVX, przygotowałem zestaw konwencjonalnych symulacji, w których cztery monomery TP–NH<sub>2</sub>–LVX osadziłem w błonie zawierającej 200 cząsteczek POPC lub 166 DMPC i 71 cząsteczek cholesterolu. Błony solwato wałem wodą i jonami, aby uzyskać pudła o rozmiarach około 8 × 8 × 10 nm. Podobnie jak wcześniej zastosowana temperatura wynosiła 310 K. Dla każdego systemu wybrałem dwie początkowe konfiguracje: 1) cztery rozdzielone od siebie monomery na odległość 2 nm oraz 2) związany tetramer. Symulacje prowadziłem do uzyskania trajektorii o długości około 600 ns.

### 3.7.5 Wpływ alkoholi na właściwości fizykochemicznych dwuwarstwy lipidowej

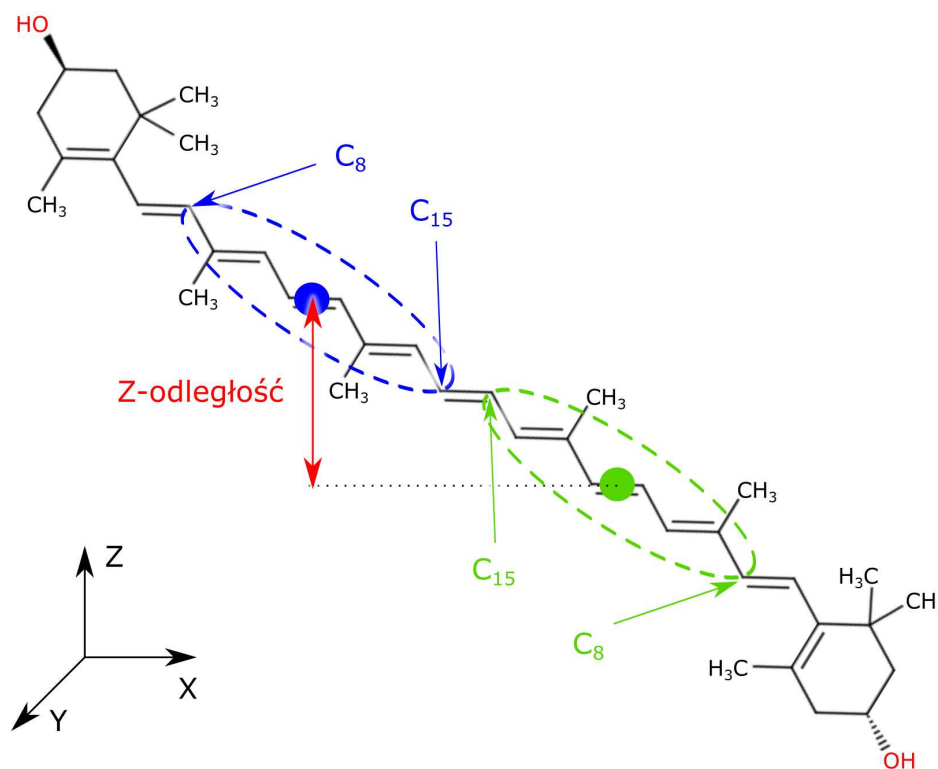
Symulowane układy składały się z błony lipidowej, zawierającej 134 cząsteczki DMPC (di-14:0 PC) oraz 66 cząsteczki alkoholu (heksanol, oktanol, dekanol lub dodekanol) w celu uzyskania stosunku molowego lipid:alkohol równego 2:1. Dodatkowo, przygotowałem jeden układ z czystą błoną DMPC, zachowując powyższą liczbę cząsteczek lipidów. Każdą z błon solwato wałem wodą oraz jonami K<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup> (siła jonowa 0.15 M), uzyskując w ten sposób systemy o wymiarach około 7 × 7 × 7.5 nm. Tak przygotowany układ zawierał około 40 000 atomów. Dla każdego z układów przeprowadziłem symulacje równowagowe (w temperaturach 28, 37 oraz 47°C), aby uzyskać trajektorie o długości około 2 μs.

W celu oceny zmiany grubości błony w poszczególnych układach, wyznaczyłem profile gęstości grup fosforanowych w zależności od odległości od środka błony. Następnie obliczyłem średnią odległość między maksimami, która często przyjmowana jest jako umowna grubość błony. Aby uzyskać dodatkowe informacje na temat czynników wpływających na zmiany grubości błony spowodowane domieszkowaniem alkoholi o różnych długościach łańcucha alkilowego, obliczyłem parametr uporządkowania S<sub>CD</sub> dla łańcuchów acylowych we wszystkich badanych układach symulacyjnych. W celu określenia stopnia nakładania się łańcuchów acylowych między warstwami błony, obliczyłem profile gęstości prawdopodobieństwa terminalnych atomów węgla C<sub>14</sub> lipidów DMPC. Dodatkowo, wyznaczyłem profile gęstości prawdopodobieństwa cząsteczek alkoholi, co pozwoliło na jakościowe oszacowanie stopnia niedopasowania hydrofobowego między alkoholami a lipidami.

### 3.7.6 Reorientacja karotenoidów w błonie

Układy symulacyjne składały się z pojedynczej cząsteczki zeaksantyny (występującej jako izomer all-trans, 9-cis lub 13-cis), osadzonej w błonie lipidowej zawierającej 146 cząsteczek DPPC (di-16:0 PC). Dodatkowo, każdy z izomerów umieściłem w błonie zawierającej 90 cząsteczek SDPC (18:0-22:6 PC), 84 cząsteczki SDPE (18:0-22:6 PE) i 26 cząsteczek SDPS (18:0-22:6 PS), której skład odpowiadał błonie neuronów siatkówki oka [177]. Błony solwato wałem wodą i jonami K<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup>, uzyskując systemy o rozmiarach około 6 × 6 × 6 nm. Tak przygotowane układy zawierały około 40 000 atomów.

Każdy z systemów poddałem wstępnemu równoważeniu (ok. 50 ns). Następnie, obliczyłem profile energii swobodnej, które opisywały zmianę orientacji cząsteczki karotenoidu względem osi prostopadłej do płaszczyzny błony (Z). Do wyznaczenia tych profili zastosowałem technikę US, gdzie współrzędną reakcji zdefiniowałem jako Z-odległość między środkami mas połówek łańcuchów polienowych (Rys. 3.14). Aby uzyskać konfiguracje startowe do poszczególnych okien US, przeprowadziłem krótką symulację sterowanej dynamiki molekularnej (o długości 40 ns), w której cząsteczka zeaksantyny zmieniała swoją orientację z pionowej (względem płaszczyzny XY) na równoległą przy zastosowaniu potencjału harmonicznego o stałej siłowej  $k = 100 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{nm}^2)$ . Następnie, dla każdego systemu przygotowałem 10 “okien” US, w których środki potencjałów były równo rozłożone (co 0.12 nm) w zakresie 0.00–1.08 nm. W każdym oknie zastosowałem potencjał harmoniczny o stałej siłowej  $k = 30 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{nm}^2)$ , który utrzymywał zadaną wartość współrzędnej reakcji. Każde okno poddałem symulacji MD aż do uzyskania trajektorii o długości około 500 ns. Po obliczeniu profili energii swobodnej, zostały one zmapowane na współrzędną  $\vartheta$  (patrz: Rys. 4.44), czyli kąt pomiędzy wektorem leżącym wzdłuż łańcucha polienowego karotenoidu a osią normalną do powierzchni błony.



**Rys. 3.14:** Wzór strukturalny zeaksantyny wraz ze współrzędną reakcji służącą do ustalenia energetyki reorientacji cząsteczki w błonie. Dla każdej połowy łańcucha polienowego zeaksantyny, wyznaczyłem środek masy na podstawie położenia atomów węgla oznaczonych od C<sub>8</sub> do C<sub>15</sub>. Następnie obliczyłem odległość między tymi środkami mas, rzutowaną na oś prostopadłą do powierzchni błony (w tym przypadku oś 'Z').



# Wyniki oraz ich dyskusja

## 4.1 Skonstruowanie modelu transbłonowej inkluzji

### 4.1.1 Motywacja dla utworzenia modelu

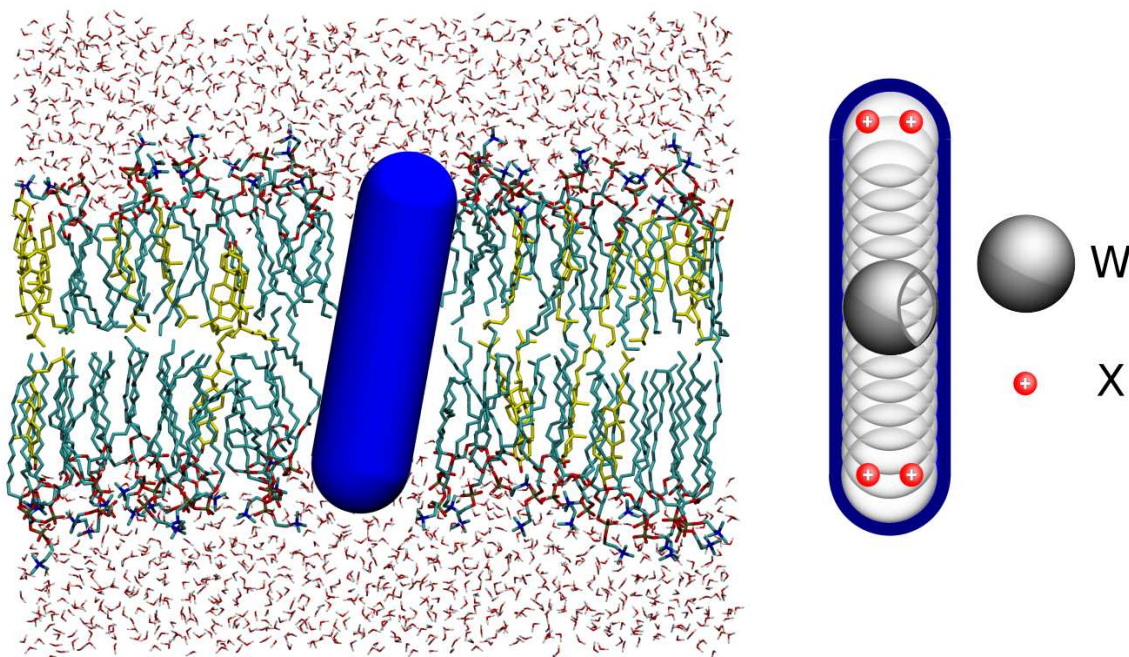
Zastosowanie prostych peptydów, takich jak WALP, w badaniach doświadczalnych umożliwiło wykazanie znaczącego wpływu niedopasowania hydrofobowego na rozmiar obszaru ścienienia błony oraz zmiany w uporządkowaniu łańcuchów acylowych lipidów otaczających peptyd [178, 179]. Ponadto, w kontekście dimeryzacji WALP stwierdzono, że dominującym czynnikiem napędzającym ten proces jest korzystna zmiana entalpii wynikająca z przyciągających oddziaływań między dwoma peptydami oraz ze wzmocnienia oddziaływań lipid-lipid [51]. Z drugiej strony, zgodnie z oczekiwaniami, dimeryzacji zwykle towarzyszy spadek entropii, który wiąże się ze zmniejszeniem swobody translacyjnej peptydów. Jednakże, w przypadku wystąpienia dodatkiego niedopasowania hydrofobowego, proces dimeryzacji peptydów może prowadzić do pozytywnego wzrostu entropii układu, wynikającego z większej swobody konformacyjnej lipidów otaczających peptydy. Co więcej, obserwuje się większą stabilność dimerów WALP w ułożeniu antyrównoległym niż równoległym, co sugeruje istotny wpływ specyficznej struktury peptydu na stabilność dimerów.

Peptydy modelowe WALP23 i WALP31 badano także z zastosowaniem symulacji dynamiki molekularnej, które miały na celu ustalenie podstaw ich segregacji pomiędzy domenami błonowymi o różnym stopniu uporządkowania konformacyjnego [46]. Wyniki tych symulacji sugerują, że krótsze peptydy wykazują większą tendencję do lokalizowania się w domenie nieuporządkowanej ( $L_D$ ) niż peptydy dłuższe. Dodatkowo stwierdzono, że transferowi peptydów do domeny nieuporządkowanej towarzyszy korzystna zmiana entalpii, zaś do domeny uporządkowanej ( $L_O$ ) korzystna zmiana entropii. Ten ostatni, nieco zaskakujący efekt, wynika z faktu, że lipidy w domenie  $L_O$  charakteryzują się wysokim stopniem upakowania. Z tego względu, przeniesienie inkluzji do domeny  $L_O$  wiąże się ze znaczącym wzrostem entropii konformacyjnej oraz translacyjnej lipidów. Takiego samego efektu nie obserwujemy, gdy peptyd zostaje przeniesiony do domeny nieuporządkowanej, gdzie nie powoduje znaczącego wzrostu entropii lipidów.

Dotychczasowe badania z wykorzystaniem peptydów, takich jak WALP, potwierdzają istotny wpływ niedopasowania hydrofobowego i upakowania lipidów na dimeryzację i segregację między domenami błonowymi o różnym stopniu uporządkowania. Jednakże te badania nie pozwalają na jednoznaczne określenie, w jakim stopniu wpływ na wspomniane procesy

ma specyficzną strukturę peptydu, a w jakim niedopasowanie hydrofobowe czy upakowanie lipidów. Ponadto, dotąd przeprowadzone badania dostarczyły tylko fragmentarycznego opisu molekularnego podłoża tych procesów, skupiając się głównie na zachowaniu lipidów otaczających inkluzję i w dużym stopniu pomijając wpływ rozpuszczalnika.

W związku z tym, aby zrozumieć uniwersalne aspekty niedopasowania hydrofobowego, zdecydowałem się opracować prosty model inkluzji błonowej, który ogranicza wpływ specyficznych oddziaływań na asocjację i segregację. Model ten składa się z dwóch rodzajów centrów oddziaływań (ziaren): i) niepolarnych, oznaczonych jako W, determinujących kształt i rozmiar inkluzji, oraz ii) elektrycznie naładowanych, oznaczonych jako X, pełniących rolę analogiczną do zasadowych reszt aminokwasowych niosących ładunek dodatni i nadających peptydom orientację transbłonową. Rys. 4.1 przedstawia opracowany model inkluzji, jego wewnętrzną strukturę oraz jego typowe usytuowanie w błonie lipidowej.



**Rys. 4.1:** Model inkluzji transbłonowej osadzonej w błonie lipidowej. Po lewej stronie przedstawiłem składniki błony lipidowej (DMPC - oznaczony na niebiesko, cholesterol - oznaczony na żółto). Po prawej stronie zaprezentowałem strukturę inkluzji jako zestawu szeregowo połączonych niepolarnych ziaren W z dodatnio naładowanymi ziarnami X, zlokalizowanymi w obrębie terminalnych ziaren W.

Zgodnie z Rys. 4.1, ziarna W zostały połączone szeregowo, natomiast ziarna X zostały osadzone we wnętrzu skrajnych ziaren W, analogicznie do konstrukcji cząsteczki wody w gruboziarnistych polach siłowych. Dodatkowo, rozmieszczenie dwóch ziaren X na obu końcach inkluzji sprawia, że jednoimienne ładunki ziaren oddziałują na siebie odpychająco, co skutkuje kątem  $\alpha_{XWX} \approx 180^\circ$ . Dzięki utrzymaniu stałego kąta  $\alpha_{XWX}$ , efektywna długość hydrofobowa inkluzji nie zmienia się w trakcie symulacji.

Ziarnom W przypisałem masę  $m_W = 50$  Da, co odpowiada przybliżonej masie czterech grup metylenowych. Ponadto, ziarnom W przypisałem ładunek  $q_W = 0e^-$ , aby zapewnić ich niepolarność. Z kolei ziarnom X przypisałem masę  $m_X = 30$  Da oraz dodatni ładunek

netto, tj.  $q_X = +1e^-$ . Wybór dodatniego ładunku dla ziaren wynika z faktu, że większość transbłonowych helis zawiera dodatnio naładowane reszty aminokwasowe (reszty lizyny bądź argininy), które oddziałują z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi na powierzchni błony i odpowiadają za utrzymanie orientacji transbłonowej [91, 173, 180, 181].

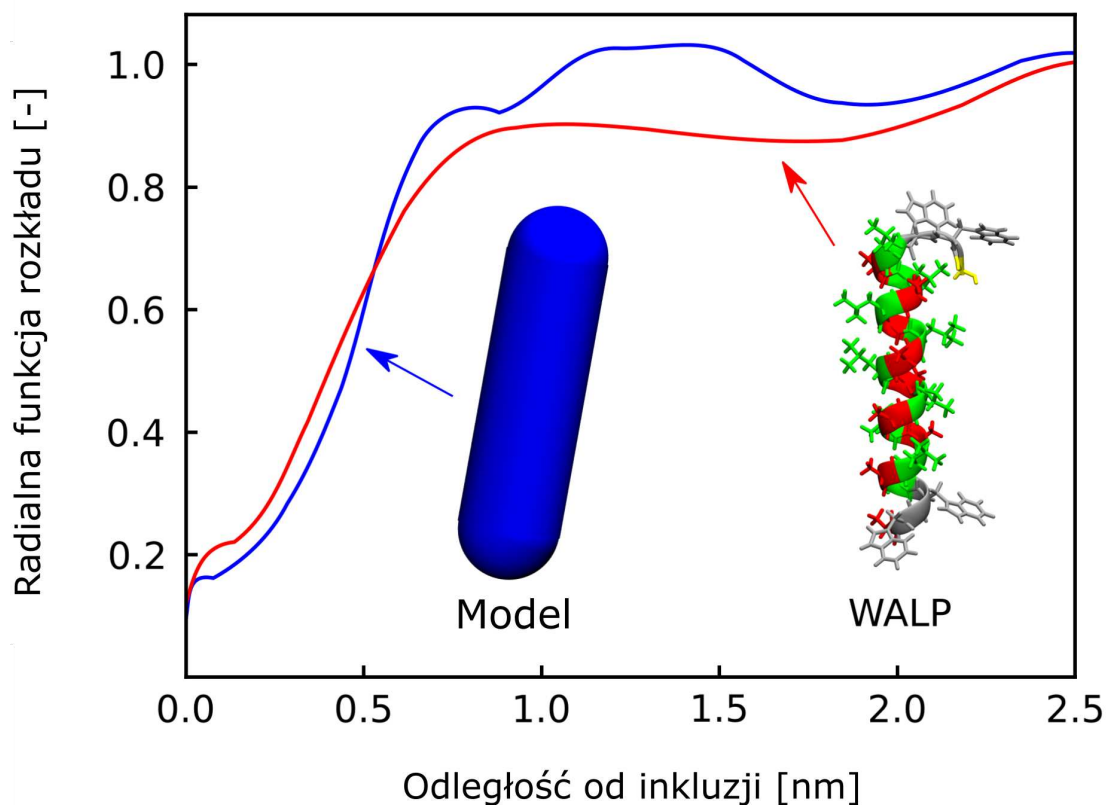
By zapewnić, że inkluzja nie będzie odkształcała się podczas symulacji, kąt między trzema ziarnami W ( $\alpha_{WWW} = 180^\circ$ ) jest kontrolowany przez zastosowanie potencjału harmonicznego o stałej siłowej  $k_\alpha = 2390 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{deg}^2)$ .

W celu uzyskania gładkiego kształtu inkluzji, odległości między ziarnami W oraz ich średnice dobrałem tak, aby ziarna nakładały się na siebie, jak zaprezentowałem na Rys. 4.1. Odległości między ziarnami W wynoszą  $d_{WW} = 0.25 \text{ nm}$ , a do ich utrzymania zastosowałem ściśle więzy zamiast potencjałów usztywniających. W ten sposób zapewniłem stałą długość inkluzji podczas symulacji, co było kluczowe szczególnie, gdy  $|\Delta D| \gg 0$  (tj. przy silnym niedopasowaniu hydrofobowym).

Do kontrolowania średnicy ziarna W wykorzystałem parametr  $\sigma$  w potencjale Lennarda-Jonesa, który został użyty do opisu oddziaływań dyspersyjnych i właściwości sterycznych inkluzji. Parametr  $\sigma_W$  sparametryzowałem tak, aby średnica inkluzji odpowiadała średnicy typowego peptydu transbłonowego. W celu wyznaczenia optymalnej wartości  $\sigma_W$ , przeprowadziłem zestaw symulacji MD (ok. 50 ns każda), w których model inkluzji o różnych wartościach  $\sigma_W$  był osadzony w błonie DMPC zawierającej 30% mol cholesterolu. Jako układ odniesienia wykorzystałem peptyd WALP, który osadziłem w takiej samej błonie. Dla każdego układu wyznaczyłem następnie radialne funkcje rozkładu (RDF; ang. radial distribution function) lipidów DMPC względem centrum masy modelowej inkluzji lub peptydu. Porównanie uzyskanych funkcji RDF pozwoliło ustalić, że modelowa inkluzja, dla której  $\sigma_W = 0.8 \text{ nm}$ , z dużym przybliżeniem odwzorowuje średnicę transbłonowej helisy w błonie, co ukazałem na Rys. 4.2.

Siła oddziaływań dyspersyjnych kontrolowana jest za pomocą parametru  $\epsilon$  w równaniu Lennarda-Jonesa. Zgodnie z równaniem 3.12 oraz Rys. 3.3, im większa wartość  $\epsilon$ , tym silniej dwa centra oddziaływań się przyciągają. Dla ziarna W wybrałem  $\epsilon_{ii} = 0.72 \text{ kcal/mol}$  oraz  $\epsilon_{ir} = 0.16 \text{ kcal/mol}$ . Wybór  $\epsilon_{ii}$  oraz  $\epsilon_{ir}$  był podyktowany potrzebą zwiększenia powinowactwa inkluzji względem siebie do poziomu charakterystycznego dla helis transbłonowych. Wymagało to, aby oddziaływania dyspersyjne między nimi ( $\epsilon_{ii}$ ) były silniejsze niż z otaczającymi je lipidami ( $\epsilon_{ir}$ ). Ze względu na to, że ziarna X znajdują się wewnątrz W, przyjąłem  $\epsilon_X = 0 \text{ kcal/mol}$ , aby X nie oddziaływały dyspersyjnie z resztą układu.

Ponadto, w modelu zastosowałem wykluczenie oddziaływań międzycząsteczkowych między ziarnami w obrębie inkluzji, z wyjątkiem elektrostatycznego odpychania ziaren X znajdujących się na tym samym końcu cząsteczki. Dzięki takiemu podejściu modelowa cząsteczka oddziałuje tylko z innymi elementami układu.



Rys. 4.2: Porównanie radialnych funkcji rozkładu (RDF) lipidów DMPC wokół peptydu WALP (na czerwono) oraz modelowej inkluzji z  $\sigma_W = 0.8$  nm (na niebiesko).

#### 4.1.2 Podsumowanie

W tym podrozdziale przedstawiłem motywację dla skonstruowania modelu inkluzji transbłonowej. Następnie szczegółowo scharakteryzowałem ten model, uzasadniając dobór wartości liczbowych dla konkretnych jego parametrów fizycznych i geometrycznych. Wartość kluczowego parametru  $\sigma_W$ , który kontroluje średnicę inkluzji dobrałem na podstawie serii dodatkowych symulacji MD. W Tabeli 1 zebrałem wszystkie parametry opisujące model inkluzji.

Tabela 1 Zestaw parametrów opisujących opracowany model inkluzji transbłonowej

Parametr	W	X	Parametr	Wartość
m	50 Da	30 Da	$d_{WW}$	0.25 nm
q	0	+1	$d_{WX}$	0.15 nm
$\sigma$	0.8 nm	0 nm	$\alpha_{WWW}$	180°
			$\epsilon_{ii}$	0.72 kcal/mol
			$\epsilon_{ir}$	0.16 kcal/mol

## 4.2 Molekularne podłoże niedopasowania hydrofobowego

Dotychczas przeprowadzone badania pokazują, że lokalna zmiana grubości błony (szczególnie jej ścienienie) na skutek niedopasowania hydrofobowego jest termodynamicznie stabilna [179, 182, 183]. Wynika to z faktu, że układ reaguje na niedopasowanie hydrofobowe, aby uniknąć ekspozycji hydrofobowych fragmentów lipidów bądź inkluzji do polarnego rozpuszczalnika. Dotychczas nie określono termodynamicznego kosztu, jaki towarzyszy wytworzeniu ujemnego niedopasowania hydrofobowego i wynikającego z niego lokalnego ścienienia błony. W związku z tym postanowiłem wyznaczyć energię swobodną przeniesienia modelowej inkluzji z błony DOPC (di-18:1 PC), w której  $\Delta D = 0$  nm, do błony DEPC (di-22:1 PC), w której  $\Delta D = -0.8$  nm. Wybór nienasyconych lipidów do tego badania podyktowany był tym, że obecność inkluzji powoduje znacznie mniejsze porządkowanie łańcuchów nienasyconych niż nasyconych. Dlatego przeniesieniu inkluzji z błony DOPC do błony DEPC towarzyszy niewielka różnica w oddziaływaniach inkluzja-łańcuchy lipidowe.

### 4.2.1 Koszt energetyczny wytworzenia ujemnego niedopasowania hydrofobowego

Wykorzystując podejście alchemiczne (opisane w podrozdziale 3.6.3), wyznaczyłem zmianę energii swobodnej ( $\Delta G_{\text{całk}}$ ) związaną z przeniesieniem inkluzji z domeny DOPC do domeny DEPC. Dodatkowo, przeprowadziłem dekompozycję otrzymanej wartości  $\Delta G_{\text{całk}}$  na składowe związane z oddziaływaniami dyspersyjnymi ( $\Delta G_{\text{dysp}}$ ) oraz elektrostatycznymi ( $\Delta G_{\text{el}}$ ). Jak ukazuje Rys. 4.3A, przeniesienie inkluzji do domeny, w której  $\Delta D = -0.8$  nm, wiąże się z kosztem  $\Delta G_{\text{całk}} = 8.6$  kcal/mol, co świadczy o niekorzystnym charakterze tego procesu z punktu widzenia termodynamiki. Warto także zauważyć, że przeniesieniu do tej domeny przeciwdziała głównie wkład związany z oddziaływaniami elektrostatycznymi ( $\Delta G_{\text{el}} = 11.5$  kcal/mol). Z drugiej strony, jeśli weźmiemy pod uwagę oddziaływania dyspersyjne, inkluzja preferuje przeniesienie z błony DOPC do błony DEPC, co znajduje odzwierciedlenie w wartości  $\Delta G_{\text{dysp}} = -3.0$  kcal/mol (zgodnie z Rys. 4.3A).

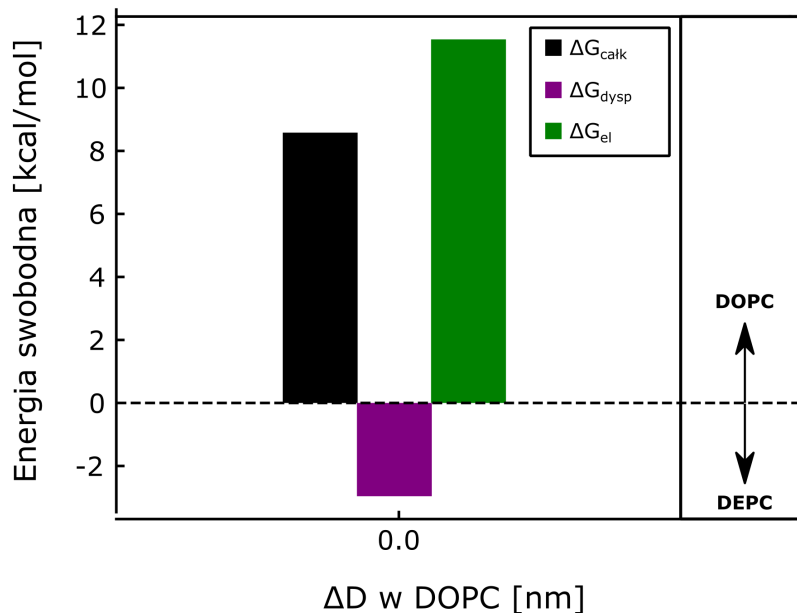
Dokonałem również dodatkowej dekompozycji  $\Delta G_{\text{całk}}$  w celu wyodrębnienia wkładów pochodzących od oddziaływań pomiędzy inkluzją a błoną (i-b; co uwzględnia też oddziaływanie inkluzja-inkluzja), jak i pomiędzy inkluzją a wodą (i-w). Zgodnie z zaprezentowanym na Rys. 4.3B zestawieniem, można zauważyć, że oddziaływania elektrostatyczne między inkluzją a błoną sprzyjają przeniesieniu inkluzji do domeny zawierającej DEPC, co ilustruje uzyskana wartość  $\Delta G_{\text{el, i-b}} = -31.2$  kcal/mol. Analogicznie, mniejszy wkład  $G_{\text{dysp, i-w}} = -2.7$  kcal/mol wskazuje, że oddziaływania dyspersyjne między inkluzją a wodą sprzyjają przeniesieniu inkluzji do domeny zawierającej DEPC. Niemniej jednak, oba te efekty są więcej niż skompensowane przez wkład wynikający z oddziaływań elektrostatycznych między inkluzją a wodą ( $\Delta G_{\text{el, i-w}} = 42.6$  kcal/mol), które sprzyjają przemieszczeniu inkluzji do domeny błonowej zawierającej DOPC. Natomiast uzyskana wartość  $\Delta G_{\text{dysp, i-b}} = 0.3$  kcal/mol jest znikomo mała, co jest zgodne z oczekiwaniami i wskazuje, że tworzenie



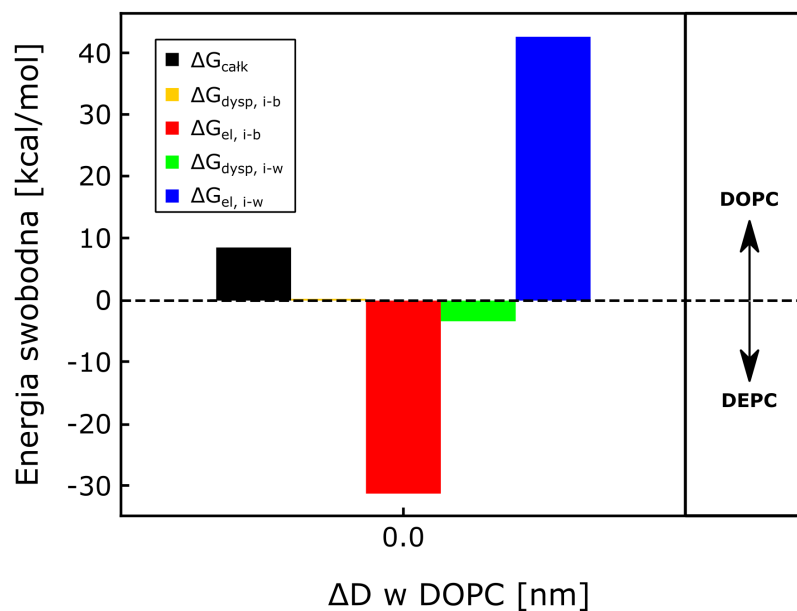


ujemnego niedopasowania hydrofobowego nie pociąga za sobą istotnych zmian w oddziaływaniach dyspersyjnych pomiędzy inkluzją a błoną.

**A**



**B**



**Rys. 4.3:** Obliczona zmiana energii swobodnej towarzysząca utworzeniu ujemnego niedopasowania hydrofobowego ( $\Delta G_{calk}$ ), wraz z dekompozycją na wkłady: dyspersyjny ( $\Delta G_{dysp}$ ) i elektrostatyczny ( $\Delta G_{el}$ ) (A), a także na wkłady odpowiadające poszczególnym elementom układu (B). Strzałki przedstawione po prawej stronie pomagają określić, jakiemu stanowi sprzyjają poszczególne wkłady do  $\Delta G$ . Wyróżnione elementy układu oznaczono symbolami: i — inkluzja, b — błona, w — rozpuszczalnik (woda).

Na podstawie przedstawionych informacji można wyciągnąć następujący wniosek: proces tworzenia ujemnego niedopasowania hydrofobowego jest termodynamicznie nieko-

rzystny, głównie z uwagi na wkład odpowiadający oddziaływaniom elektrostatycznym z udziałem rozpuszczalnika wodnego. Kolejnym istotnym spostrzeżeniem jest to, że oddziaływania między inkluzją a lipidami błonowymi sprzyjają tworzeniu ujemnego niedopasowania hydrofobowego. To stwierdzenie jest sprzeczne z intuicyjnym założeniem sugerującym, że formowanie lokalnego ściwienia błony będzie niekorzystnym procesem z powodu dostosowania efektywnej długości lipidów do inkluzji.

#### 4.2.2 Zmiana rozkładu cząsteczek wody i lipidów w sąsiedztwie inkluzji w odpowiedzi na wytworzenie ujemnego niedopasowania hydrofobowego

Otrzymane wyniki skłoniły mnie do bliższego zbadania odpowiedzi cząsteczek wody i lipidów na zaburzenie wywołane wprowadzeniem inkluzji do błon DOPC i DEPC. W tym celu wyznaczyłem różnicowe profile gęstości  $\Delta\rho(Z)$ , które opisują zmiany rozkładu cząsteczek spowodowane pojawieniem się inkluzji w błonie, zgodnie z równaniem:

$$\Delta\rho(Z) = \rho_i(Z) - \rho_{\text{bulk}}(Z).$$

W równaniu 4.2.2,  $\rho_i(Z)$  oznacza profil gęstości cząsteczek w sąsiedztwie inkluzji (gdzie  $Z$  oznacza odległość od środka błony wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni błony; patrz: Rys. 4.4A), natomiast  $\rho_{\text{bulk}}(Z)$  oznacza ten sam profil w błonie niezaburzonej (ang. bulk), czyli niezawierającej inkluzji.

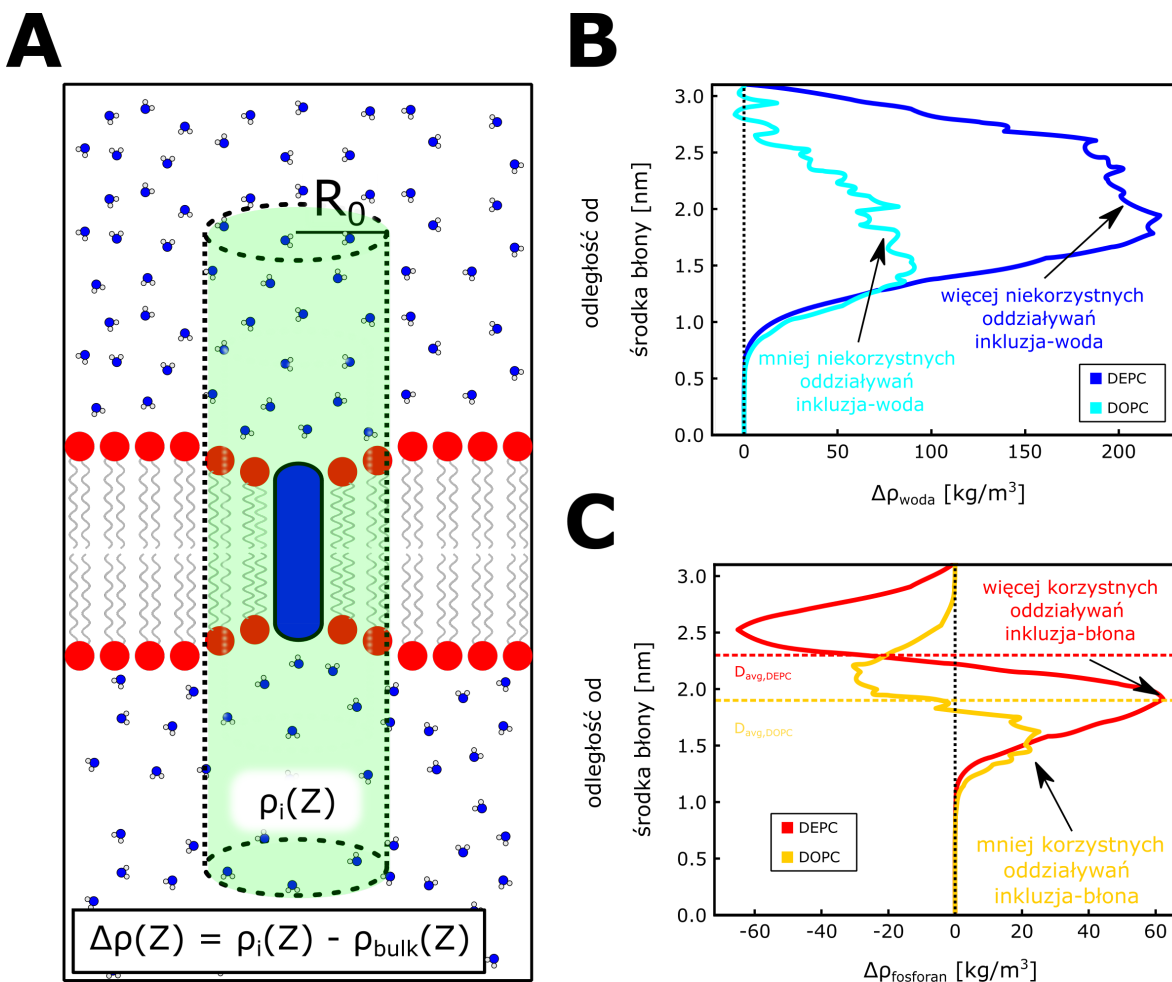
Aby opisać zachowanie lipidów, wyznaczyłem także  $\rho_i(Z)$  dla grup fosforanowych, oddziałujących z dodatnio naładowaną inkluzją. Warto w tym miejscu dodać, że ponieważ ugrupowaniom fosforanowym odpowiadają wyraźne piki w mierzalnych profilach gęstości elektronowej stanowią one zwykle punkt odniesienia dla pomiaru grubości błon.

Do opisu rozkładu wody wokół inkluzji wyznaczyłem  $\rho_i(Z)$  dla atomów tlenu.

Analizując zmiany gęstości wody (Rys. 4.4B) możemy zauważyć, że w przypadku inkluzji umieszczonej w błonie DEPC (gdzie  $\Delta D = -0.8$  nm) maksimum zmian gęstości wody jest znacznie większe niż w przypadku, gdy inkluzję umieszczono w błonie DOPC ( $\Delta D = 0$  nm). To wskazuje na większą liczbę cząsteczek wody wnikaających do błony, w której występuje niedopasowanie hydrofobowe. Wobec tego możemy stwierdzić, że ta błona jest bardziej zaburzona niż w przypadku, gdy  $\Delta D = 0$  nm. Ten wynik jest zgodny z rezultatem przedstawionym na Rys. 4.3B, który wskazuje, że oddziaływania elektrostatyczne z udziałem wody przeciwdziałają przeniesieniu inkluzji do błony DEPC, czyli tworzeniu niedopasowania hydrofobowego.

Z kolei, analizując różnicowe profile gęstości dla grup fosforanowych (Rys. 4.4C), obserwujemy znacznie większe zmiany gęstości w zakresie 1.0–2.2 nm w przypadku błony DEPC, w porównaniu do błony DOPC. To wskazuje na znacznie większy wzrost liczby kontaktów między inkluzją a grupami fosforanowymi w błonie DEPC, w przeciwieństwie do błony DOPC. Uzyskany przeze mnie rezultat jest zgodny z wynikami dekompozycji energii swobodnej przedstawionymi na Rys. 4.3B, które wskazują, że przeniesieniu inkluzji do błony





**Rys. 4.4:** Wyznaczone zmiany gęstości wybranych atomów spowodowane obecnością inkluzji w błonie. (A) Schemat ilustrujący lokalny obszar układu wokół inkluzji ( $R_0 = 2.0$  nm), w którym została obliczona gęstość. (B) Różnicowy profil gęstości wody wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni błony,  $\Delta\rho$ , obliczony jako różnica profili gęstości wody w sąsiedztwie inkluzji oraz dla błony niezaburzonej (DEPC – linia niebieska, DOPC – linia błękitna). (C) Różnicowy profil gęstości fosforanów wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni błony,  $\Delta\rho$ , obliczony jako różnica profili gęstości fosforanów w sąsiedztwie inkluzji oraz dla błony niezaburzonej. Osobno pokazany jest dla inkluzji umieszczonej w błonie DEPC (czerwony) oraz błonie DOPC (pomarańczowy). Średnie odległości pomiędzy grupami fosforanowymi a środkiem dwuwarstwy, które umownie odpowiadają połowie grubości błony w niezaburzonych błonach ( $D_{avg}$ ), zostały oznaczone poziomymi liniami przerywanymi.

DEPC (tworzeniu ujemnego  $\Delta D$ ) sprzyjają przede wszystkim oddziaływania elektrostatyczne inkluzja-błona.

#### 4.2.3 Podsumowanie

W tym podrozdziale przedstawiłem wyniki badań dotyczących termodynamicznego kosztu tworzenia ujemnego niedopasowania hydrofobowego w obrębie błon fosfolipidowych. Wykorzystałem procedurę opartą na podejściu alchemicznym, które pozwala na stosunkowo łatwą i precyzyjną dekompozycję energetyki procesu na składowe wynikające z oddziaływań dyspersyjnych i elektrostatycznych pomiędzy wybranymi elementami układu.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że tworzenie ujemnego niedopasowania hydrofobowego jest procesem termodynamicznie niekorzystnym. Jest to głównie wynikiem zwiększenia niekorzystnych kontaktów pomiędzy lokalnym otoczeniem inkluzji

a cząsteczkami wody. Przeciwnie, powstawaniu ujemnego niedopasowania hydrofobowego sprzyjają oddziaływania między inkluzją, a błoną, co prowadzi do zwiększenia kontaktów pomiędzy grupami fosforanowymi lipidów a inkluzją o dodatnim ładunku.

Wyznaczone przeze mnie różnicowe profile gęstości umożliwiają wizualizację zmian w liczbie kontaktów między inkluzją a wodą bądź lipidami w badanym procesie. Stanowią one uzupełnienie wyników uzyskanych przy pomocy podejścia alchemicznego, która ukazuje molekularne siły napędowe badanego procesu. Z tego powodu różnicowe profile gęstości będą wykorzystane także w dalszych badaniach.

### 4.3 Wpływ niedopasowania hydrofobowego na dimeryzację inkluzji błonowych

#### 4.3.1 Ujemne niedopasowanie hydrofobowe

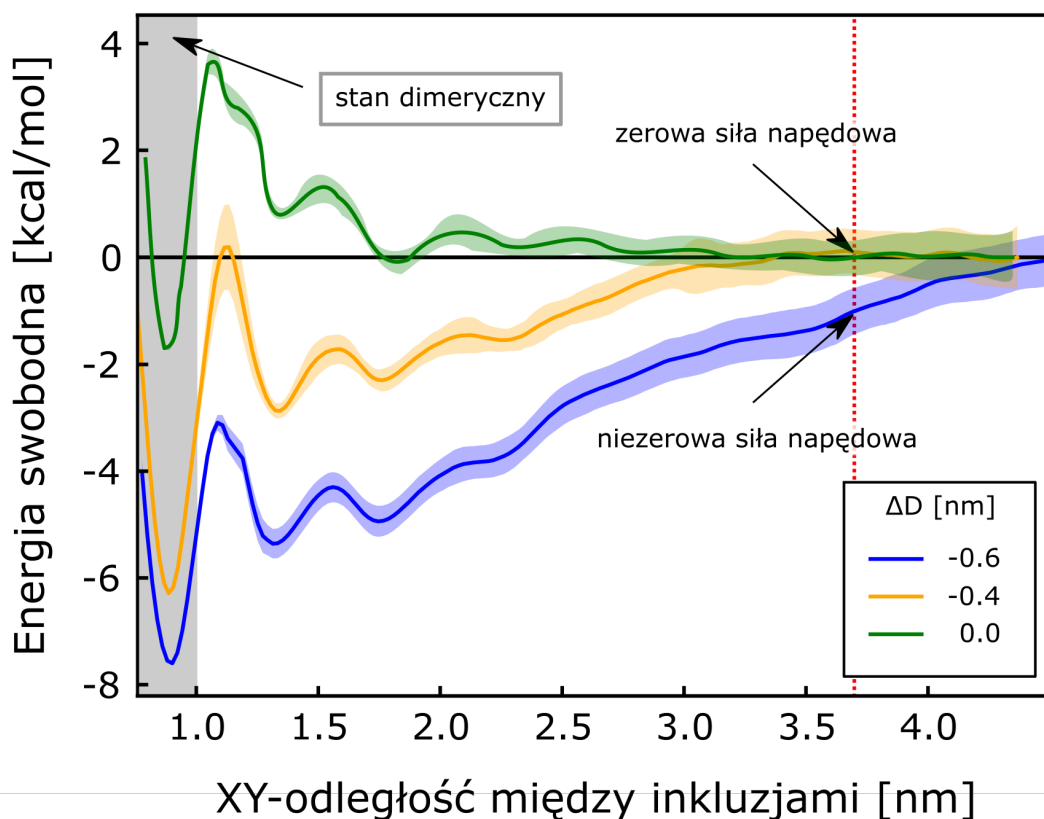
Jak wspomniałem we wprowadzeniu, jedną z możliwych odpowiedzi układu na ujemne niedopasowanie hydrofobowe jest samoasocjacja inkluzji. Celem badań w tej części pracy było ustalenie uniwersalnego mechanizmu tego procesu, obejmującego rolę cząsteczek lipidów oraz wody w stabilizacji powstających dimerów.

W związku z tym przeprowadziłem serię symulacji, które miały na celu ocenę stabilności dimerów w zależności od wartości  $\Delta D$ . Skonstruowałem kilka systemów, różniących się długością inkluzji (a więc również  $\Delta D$ ). Inkluzje zostały osadzone w uporządkowanej błonie DMPC/CHL. Do wyznaczenia zmian entalpii swobodnej towarzyszących schodzeniu się inkluzji ze sobą wykorzystałem metodę umbrella sampling (patrz: podrozdział 3.7.1), gdzie jako współrzędną reakcji wybrałem XY-odległość między środkami mas asocjujących inkluzji (tj. odległość między ich centrami masy zrzutowana na płaszczyznę równoległą do powierzchni błony). Na Rys. 4.5 przedstawiłem profile energii swobodnej dla procesu dimeryzacji inkluzji w uporządkowanej błonie (DMPC/CHL) dla dwóch różnych wartości ujemnego niedopasowania hydrofobowego oraz przy braku niedopasowania.

Z Rys. 4.5 widać, że dla  $\Delta D = 0.0$  nm w odległości 0.95 nm pojawia się płytkie minimum energetyczne ( $-1.8$  kcal/mol) odpowiadające stanowi dimerycznemu. Przyjmując, że stan dimeryczny odpowiada zakresowi odległości do 1.0 nm, na podstawie profilu wyznaczyłem standardową entalpię swobodną dimeryzacji, która wynosi 0.2 kcal/mol. Rys. 4.5 pokazuje także, że dla  $\Delta D = 0.0$  nm w odległości większej niż 1.7 nm krzywa energii swobodnej wypłaszcza się. Ponieważ pochodna energii swobodnej równa jest średniej sile działającej wzdłuż współrzędnej reakcji, można wnioskować, że dla  $\Delta D = 0$  nm przy większych odległościach pomiędzy inkluzjami nie działają siły sprzyjające dimeryzacji.

Sytuacja znacząco różni się w przypadku ujemnego niedopasowania hydrofobowego. Rzeczywiście, jak widać z Rys. 4.5, dla  $\Delta D = -0.4$  nm i  $\Delta D = -0.6$  nm występują głębokie minima odpowiadające stanowi dimerycznemu (odpowiednio  $-6.3$  kcal/mol i  $-7.6$  kcal/mol). Taki kształt profili przekłada się na standardowe entalpie swobodne dimeryzacji wynoszące odpowiednio  $-4.4$  kcal/mol i  $-5.8$  kcal/mol. Wartości te jednoznacznie wskazują, że



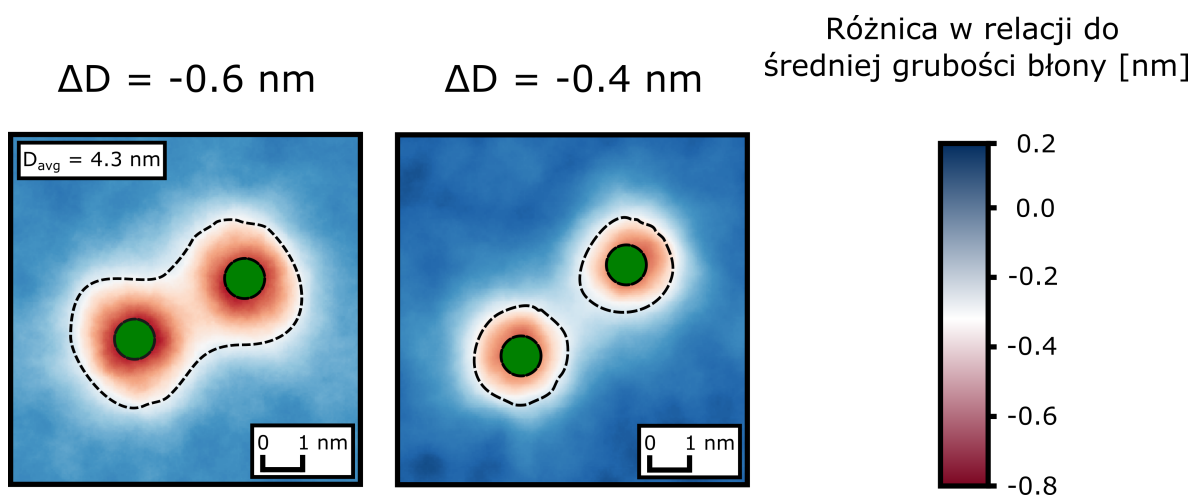


**Rys. 4.5:** Profile energii swobodnej dla procesu dimeryzacji inkluzji w błonie uporządkowanej (DMPC/CHL) w przypadku zerowego bądź ujemnego niedopasowania hydrofobowego. Czerwoną, przerywaną linią zaznaczono odległość pomiędzy inkluzjami, przy której dla największego niedopasowania ( $\Delta D = -0.6$  nm) pojawia się niezerowa siła napędowa do dimeryzacji. Dla tej samej odległości w przypadku mniejszego niedopasowania nie występują siły prowadzące do dimeryzacji. Obszar, który jest zaznaczony na szaro, odpowiada zakresowi współrzędnej reakcji, w którym układ znajduje się w stanie dimerycznym.

obecność ujemnego niedopasowania hydrofobowego sprzyja tworzeniu stabilnych dimerów inkluzji błonowych.

Co bardzo istotne, w przeciwieństwie do przypadku  $\Delta D = 0$ , można zauważyć, że krzywe opisujące dimeryzację inkluzji o ujemnym  $\Delta D$  są nachylone w szerokim zakresie odległości, a ich kształty wypłaszczają się dopiero przy odległościach wynoszących 3.0 oraz 4.5 nm, odpowiednio dla  $\Delta D = -0.4$  kcal/mol i  $\Delta D = -0.6$  kcal/mol. To nachylenie krzywych wskazuje na obecność dalekozasięgowych sił napędzających dimeryzację inkluzji, których zasięg jest tym większy, im bardziej ujemne jest  $\Delta D$ .

Skupiłem się dalej na wyjaśnieniu przyczyn pojawiania się tych dalekozasięgowych sił w układach, w których  $\Delta D = -0.4$  nm oraz  $\Delta D = -0.6$  nm. W tym celu wyznaczyłem mapy lokalnej grubości błony dla obu układów przy odległości między inkluzjami wynoszącej 3.7 nm, zgodnie z Rys. 4.5 (stan zdysocjowany). Kolory na mapie reprezentują różnicę między lokalną grubością  $D$  a średnią grubością błony niezaburzonej, oznaczoną jako  $D_{avg}$ . Na uzyskanych mapach zazaczyłem obszar lokalnego ściwienia błony, przyjmując arbitralnie wartość graniczną  $D_{limit} = D_{avg} - 0.3$  nm.



Rys. 4.6: Różnicowe mapy grubości błony DMPC/CHL zawierającej inkluzje przy  $\Delta D = -0.6$ – $-0.4$  nm, gdy odległość między inkluzjami wynosi 3.7 nm (stan zdysocjowany). Skala kolorystyczna opisuje różnice między grubością lokalną ( $D$ ) a średnią grubością błony niezaburzonej ( $D_{avg}$ ). Linia przerywaną zaznaczono obszary lokalnego ścienienia błony.

Jak widać na Rys. 4.6, dla  $\Delta D = -0.6$  nm obszary ścienienia błony w otoczeniu inkluzji są znacznie większe, co prowadzi do ich nakładania. To sprawia, że już przy dużych odległościach zbliżanie się inkluzji w tym układzie wiąże się ze zmniejszaniem się wypadkowego obszaru zaburzenia. W rezultacie pojawia się dalekozasięgowa siła pomiędzy inkluzjami, która nie wynika z ich bezpośredniego przyciągania się, lecz jest mediowana przez cząsteczki lipidów i wody. Ten efekt można również wyjaśnić za pomocą teorii napięcia liniowego, według której układ dąży do minimalizacji obwodu obszaru zaburzonego w błonie.

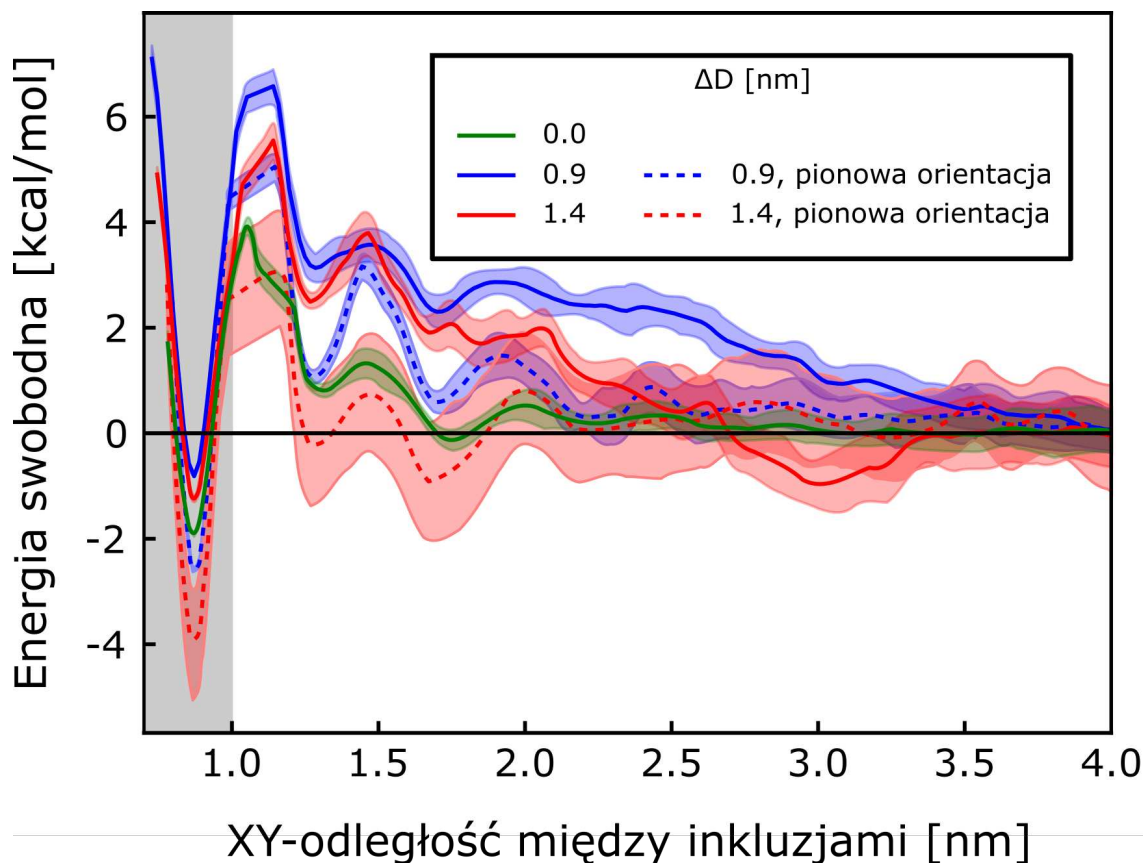
W porównaniu do tego, gdy  $\Delta D = -0.4$  nm, obszary zaburzenia błony są znacznie mniejsze i nie nachodzą na siebie przy dużych odległościach, co wyjaśnia brak dalekozasięgowych sił prowadzących do dimeryzacji inkluzji w odległości między inkluzjami wynoszącej 3.7 nm.

Uzyskane przeze mnie mapy grubości błony (Rys. 4.6) pozwalają na wyjaśnienie istotnych różnic w kształtach profili energii swobodnych w kontekście ujemnego niedopasowania hydrofobowego (Rys. 4.5). Wyraźnie widać, że dla  $\Delta D = -0.6$  nm obszary zaburzenia są znacznie większe niż dla  $\Delta D = -0.4$  nm. Ta różnica wpływa na zwiększoną stabilność dimerów inkluzji, co potwierdzają zarówno większa głębokość minimum jak i wartości standardowej energii swobodnej dimeryzacji. Warto również zauważyć, że siły stabilizujące inkluzje, które są mediowane przez lipidy i wodę, wykazują znacznie większy zasięg dla  $\Delta D = -0.6$  nm w porównaniu do  $\Delta D = -0.4$  nm, co ilustrują nachylenia krzywych na Rys. 4.5. Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają, że wielkość ujemnego niedopasowania hydrofobowego istotnie wpływa na stabilność dimerów inkluzji w błonie lipidowej.

#### 4.3.2 Dodatnie niedopasowanie hydrofobowe

W analogiczny sposób przeprowadziłem analizę stabilności dimerów w przypadku  $\Delta D > 0$ . W tym celu wyznaczyłem profile energii swobodnej opisujące proces dimeryza-

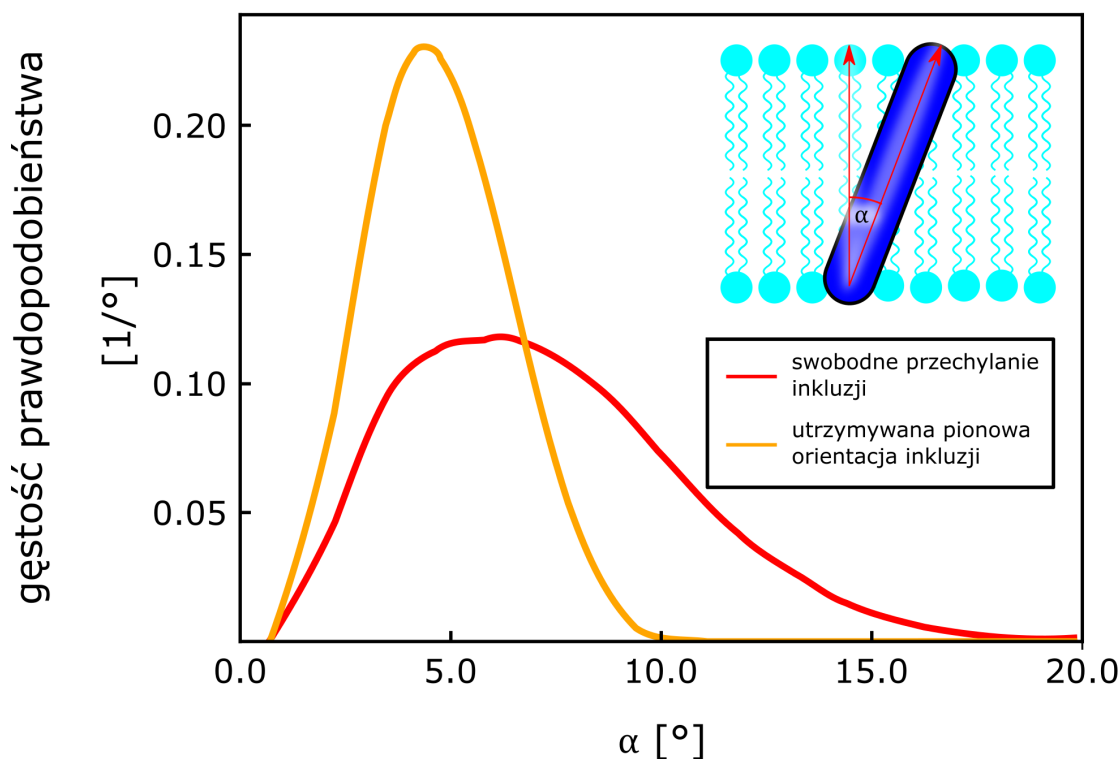
cji inkluzji (dla których  $\Delta D$  była równa 0.9 oraz 1.4 nm) w układzie z błoną DMPC/CHL. Obliczenia te zostały przeprowadzone z wykorzystaniem takiej samej współrzędnej reakcji, co poprzednio. Uzyskane profile zostały porównane na Rys. 4.7 z przypadkiem zerowego niedopasowania hydrofobowego.



**Rys. 4.7:** Profile energii swobodnej dla procesu dimeryzacji inkluzji w błonie uporządkowanej (DMPC/CHL) w przypadku zerowego bądź dodatniego niedopasowania hydrofobowego. Linie przerywane odpowiadają analogicznym profilom, w sytuacji gdy inkluzje utrzymywane są w orientacji prostopadłej do powierzchni błony. Zaznaczony na szaro zakres współrzędnej reakcji odpowiada stanowi dimerycznemu.

Na Rys. 4.7 możemy zaobserwować, że dla  $\Delta D = 0.9$  nm głębokość minimum odpowiadającego stanowi dimerycznemu wynosi  $-0.4$  kcal/mol, podczas gdy dla  $\Delta D = 1.4$  nm głębokość ta wynosi  $-1.0$  kcal/mol. Wyznaczone standardowe entalpie swobodne dimeryzacji wyniosły odpowiednio  $1.4$  kcal/mol oraz  $-0.4$  kcal/mol. W związku z tym, w przypadku dodatniego  $\Delta D$  inkluzje wykazują dużo mniejszą tendencję do dimeryzacji niż miało to miejsce w przypadku ujemnego  $\Delta D$ . Ponadto, nachylenia krzywych wskazują na występowanie dalekozasięgowych sił przeciwdziałających dimeryzacji.

Jak wspominałem we wprowadzeniu, jedną z możliwych odpowiedzi układu na dodatnie niedopasowanie hydrofobowe jest przechylenie się inkluzji. Stąd też zamierzałem sprawdzić, w jakim stopniu przechylenie się inkluzji wpływa na stabilność dimerów. W pierwszym kroku wyznaczyłem profil gęstości prawdopodobieństwa pojawienia się inkluzji w zadanym nachyleniu względem osi prostopadłej do powierzchni błony. Na Rys. 4.8 widzimy, że w przypadku  $\Delta D = 1.4$  nm profil przybiera szeroki kształt. Dodatkowo, obserwu-



Rys. 4.8: Rozkład kąta przechylenia inkluzji w błonie DMPC/CHL (kat  $\alpha$ ) dla  $\Delta D = 1.4$  nm w przypadku swobodnym oraz po przyłożeniu dodatkowego potencjału usztywniającego orientację inkluzji.

jemy, że inkluzja ma zdolność do przechylania się o kąt około  $18^\circ$ . Wynika stąd, że inkluzje, w obliczu dodatniego  $\Delta D$ , skłonne są do zmiany orientacji poprzez przechylenie. Ten proces umożliwia inkluzjom dostosowywanie swojej efektywnej długości hydrofobowej (rozumianej jako długość inkluzji rzutowana na oś prostopadłą do powierzchni błony). Działanie to minimalizuje ich ekspozycję na rozpuszczalnik i zapobiega lokalnemu zwiększeniu grubości błony.

Następnie zadałem sobie pytanie, czy wzajemne powinowactwo inkluzji o dodatnim niedopasowaniu zależy od ich orientacji. W celu odpowiedzi na to pytanie, przeprowadziłem dodatkowe symulacje, w których, przy pomocy zewnętrznego potencjału, utrzymywałem inkluzje w orientacji prostopadłej do powierzchni błony (pionowej). Jak to wynika z rozkładu kąta przechylenia na Rys. 4.8, taki zabieg rzeczywiście pozwolił na ograniczenie swobody orientacyjnej inkluzji w prowadzonych przeze mnie symulacjach.

Profile energii swobodnej, przedstawione na Rys. 4.7, ukazują, że dla inkluzji o usztywnionej orientacji pionowej, przy  $\Delta D = 0.9$  nm, minimum jest głębsze o 1.8 kcal/mol. Ponadto, standardowa entalpia swobodna dimeryzacji dla takich inkluzji jest o 1.8 kcal/mol bardziej korzystna niż dla inkluzji naturalnie przechylonych. Analogicznie, gdy  $\Delta D = 1.4$  nm, minimum było głębsze o 2.9 kcal/mol, a standardowa entalpia swobodna dimeryzacji

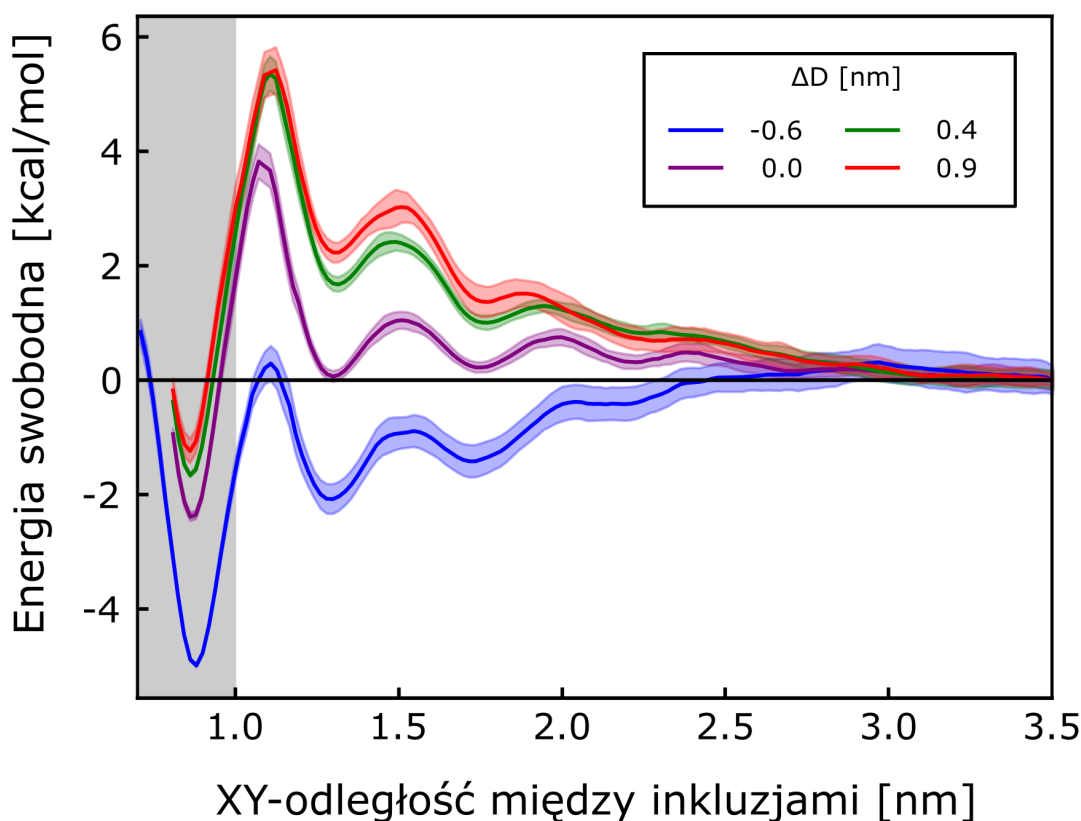


o 1.5 kcal/mol korzystniejsza. Uzyskane wyniki potwierdzają zatem, że orientacja inkluzji ma znaczący wpływ na tendencję do asocjacji.

Przeprowadzone przez mnie symulacje wykazały zatem, że asocjacja inkluzji w przypadku, gdy  $\Delta D > 0$ , jest preferowana wówczas, gdy inne rodzaje odpowiedzi na niedopasowanie, takie jak przechylenie, są trudne do zrealizowania. Wyniki te mogą tłumaczyć dlaczego większe białka transbłonowe, nie mogące ulegać przechyleniu (np. rodopsyna), wykazują znaczną skłonność do dimeryzacji pod wpływem dodatniego niedopasowania hydrofobowego.

#### 4.3.3 Uporządkowanie lipidów a dimeryzacja inkluzji wywołana niedopasowaniem hydrofobowym

Zadałem następnie pytanie, w jakim stopniu uporządkowanie lipidów wpływa na dimeryzację inkluzji wywołaną niedopasowaniem hydrofobowym. W tym celu wyznaczyłem profile energii swobodnej opisujące dimeryzację inkluzji o czterech różnych długościach, osadzonych w błonie DOPC (reprezentującej domenę nieuporządkowaną,  $L_D$ ). Uzyskane przez mnie wyniki porównałem z analogicznymi rezultatami uzyskanymi dla błony DMPC/CHL (reprezentującej domenę uporządkowaną,  $L_O$ ).

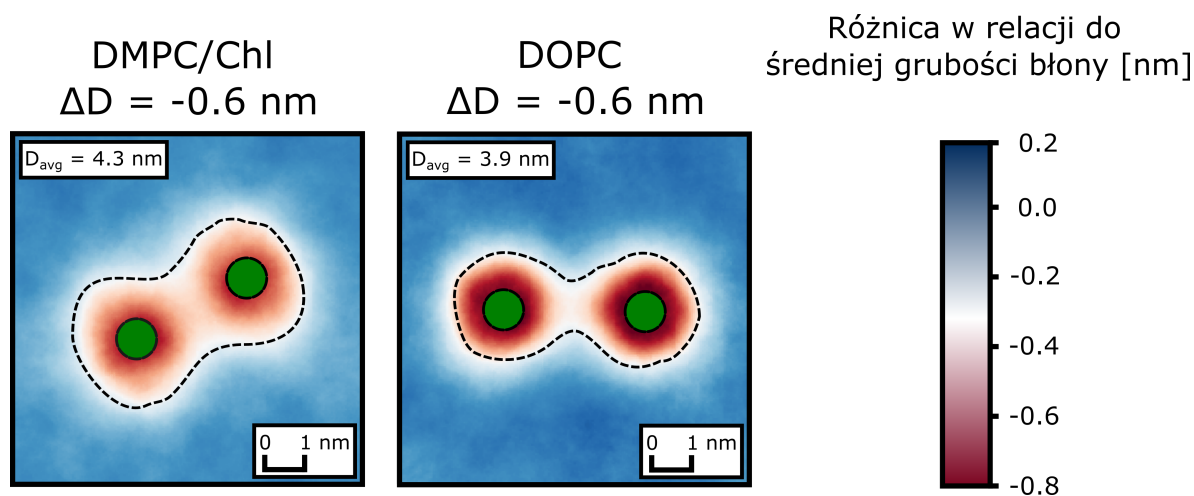


Rys. 4.9: Profile energii swobodnej dla dimeryzacji inkluzji w błonie nieuporządkowanej (DOPC) dla przypadku zerowego, ujemnego oraz dodatniego niedopasowania hydrofobowego. Zaznaczony na szaro jest zakres współrzędnej reakcji odpowiadający stanowi dimerycznemu.



Z Rys. 4.9 widać, że w przypadku zerowego  $\Delta D$  minimum ma większą głębokość w błonie DOPC ( $-2.4$  kcal/mol) w porównaniu do DMPC/CHL ( $-1.8$  kcal/mol). To przekłada się na standardową entalpię swobodną dimeryzacji o wartości  $-0.4$  kcal/mol w przypadku błony DOPC, w porównaniu do błony DMPC/CHL, dla której standardowa entalpia swobodna dimeryzacji wynosi  $0.2$  kcal/mol. Podobnie jak w przypadku uporządkowanej błony, wydłużenie inkluzji nie przyczynia się do zwiększenia stabilności dimerów, co jest odzwierciedlone w wyraźnie mniejszej głębokości minimum.

Co bardzo interesujące, porównując inkluzje w błonach DMPC/CHL i DOPC, dla których  $\Delta D = -0.6$  nm, można zauważyć, że w błonie nieuporządkowanej głębokość minimum oraz standardowa entalpia swobodna dimeryzacji (odpowiednio  $-5.0$  kcal/mol i  $-3.0$  kcal/mol) są mniejsze niż w błonie uporządkowanej (odpowiednio  $-7.6$  kcal/mol i  $-5.8$  kcal/mol). Uzyskane przez mnie rezultaty są zgodne z wynikami doświadczalnymi, w których wykazano, że wzrost uporządkowania błony wiąże się z zwiększoną stabilnością dimerów [184]. W celu zbadania molekularnego podłoża tych różnic, postanowiłem porównać różnicowe mapy lokalnej grubości błony w otoczeniu inkluzji w błonie DOPC oraz DMPC/CHL.



**Rys. 4.10:** Porównanie map lokalnej grubości w uporządkowanych (DMPC/CHL) i nieuporządkowanych (DOPC) domenach błonowych przy największym ujemnym niedopasowaniu hydrofobowym ( $\Delta D = -0.6$  kcal/mol), gdy XY-odległość między nimi wynosi 3.7 nm. Za pomocą skali kolorystycznej przedstawione są różnice między lokalną grubością błony a średnią grubością błony niezaburzonej ( $D_{avg}$ ). Linia przerywaną wyznaczono obszary lokalnego ściśnienia grubości błony.

Na Rys. 4.10 zauważymy, że w przypadku obu domen grubość błony w sąsiedztwie inkluzji jest znacznie zmniejszona. Niemniej jednak, profil energii swobodnej, opisujący proces dimeryzacji inkluzji przy najbardziej ujemnym  $\Delta D$  w błonie nieuporządkowanej (ukazany na Rys. 4.9), przyjmuje płaski przebieg dla XY-odległości większych niż 2.5 nm. W związku z tym, analiza lokalnej grubości błony okazuje się niewystarczająca do pełnego zrozumienia wpływu uporządkowania lipidów na stabilność dimerów inkluzji w błonie.

#### 4.3.4 W jaki sposób lipidy i woda wpływają na dimeryzację inkluzji?

Jak pokazałem w podrozdziale 4.2.2, tworzenie ujemnego niedopasowania hydrofobowego prowadzi do zwiększenia liczby kontaktów między błoną a wodą w sąsiedztwie inkluzji, co generuje niekorzystny wkład energetyczny pochodzący od oddziaływań z udziałem wody. Z drugiej strony, tworzenie ujemnego niedopasowania hydrofobowego wpływa na wzmocnienie oddziaływań elektrostatycznych między inkluzją a grupami fosforanowymi lipidów, co przekłada się na korzystny wkład do energii swobodnej pochodzący od oddziaływań inkluzja-błona.

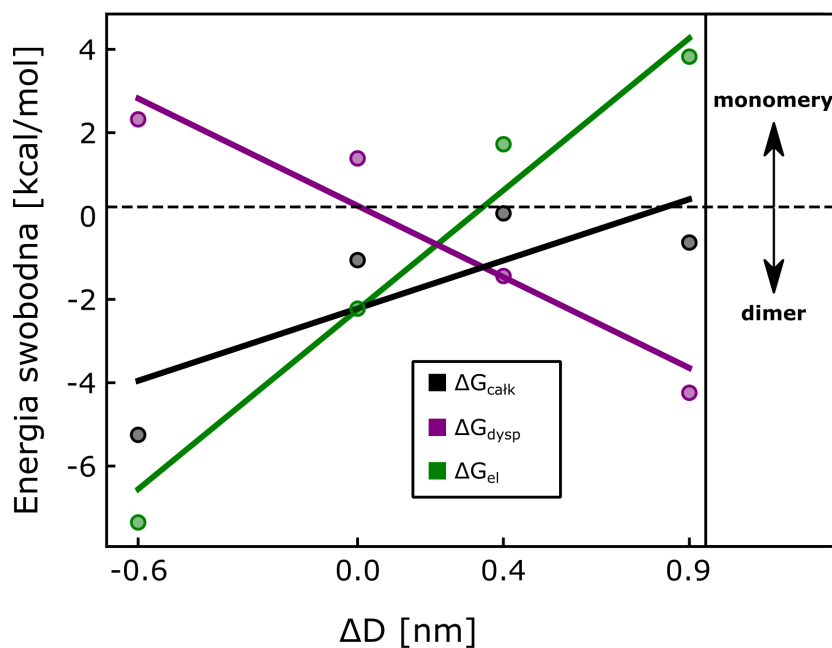
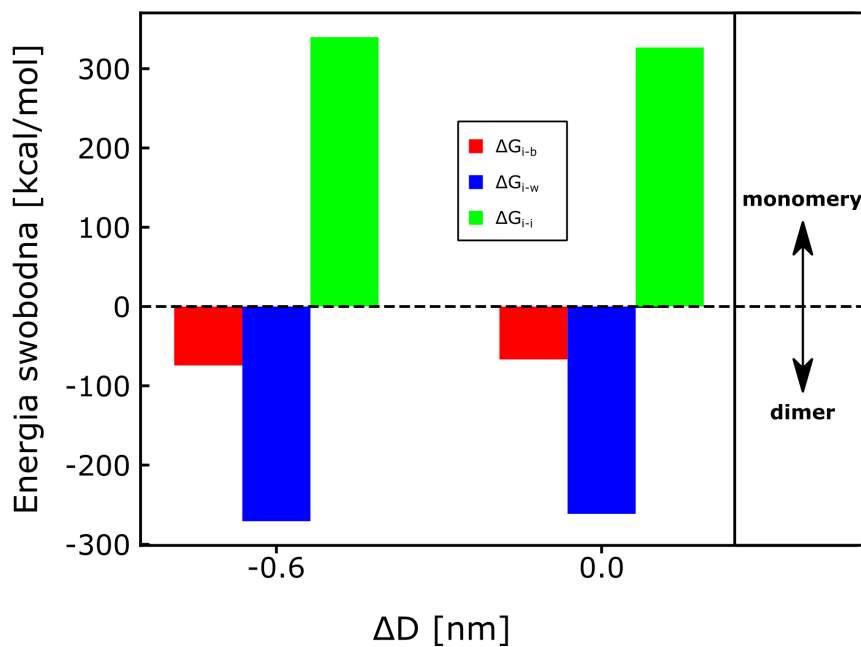
Aby dodatkowo przetestować te wnioski, przeprowadziłem niezależne obliczenia energetyki dimeryzacji inkluzji, a następnie zdekomponowałem ją na wkłady wynikające z oddziaływań dyspersyjnych oraz elektrostatycznych. W tym celu posłużyłem się podejściem alchemicznym (opisanym w podrozdziale 3.6.3). Do obliczeń zastosowałem cykl termodynamiczny, który przedstawiłem na Rys. 3.10. Podobnie jak poprzednio, uwzględniłem inkluzje o różnych długościach, które odpowiadają przypadkom  $\Delta D$  równym  $-0.6$ ,  $0.0$ ,  $0.4$  oraz  $0.9$  nm. Te badania przeprowadziłem z wykorzystaniem błony DMPC/CHL.

Jak widać z Rys. 4.11A, uzyskana entalpia swobodna dimeryzacji w przypadku  $\Delta D = -0.6$  nm wynosiła  $-5.3$  kcal/mol, co oznacza, że inkluzje przy ujemnym niedopasowaniu hydrofobowym wykazują tendencję do dimeryzacji. W przypadku zerowego niedopasowania hydrofobowego tendencja ta jest wyraźnie słabsza, co objawia się entalpią swobodną dimeryzacji wynoszącą  $-1.2$  kcal/mol. Natomiast w przypadku dodatniego niedopasowania hydrofobowego uzyskałem wartości energii swobodnej dimeryzacji wynoszące  $-0.2$  kcal/mol dla  $\Delta D = 0.4$  nm oraz  $-0.7$  kcal/mol dla  $\Delta D = 0.9$  nm. Wyznaczona przeze mnie linia trendu wykazuje wyraźny wzrost stabilności dimerów wraz ze zwiększającym się ujemnym  $\Delta D$ . Porównanie obu przypadków dodatniego niedopasowania hydrofobowego wskazuje na nieznaczny wzrost stabilności dimerów wraz ze zwiększaniem się  $\Delta D$ .

Na podstawie dekompozycji  $\Delta G_{\text{całk}}$  na składniki wynikające z oddziaływań dyspersyjnych i elektrostatycznych (na Rys. 4.11A), można zaobserwować dwie przeciwne tendencje zależne od  $\Delta D$ . Z jednej strony, wkład elektrostatyczny wynosi  $-7.4$  kcal/mol w przypadku  $\Delta D = -0.6$  nm, a zwiększa się do  $3.5$  kcal/mol, gdy  $\Delta D = 0.9$  nm. Jednocześnie, wartość wkładu dyspersyjnego spada z  $2.0$  kcal/mol do  $-4.2$  kcal/mol. Można z tego wywnioskować, że siły napędowe dla dimeryzacji przy  $\Delta D < 0$  oraz  $\Delta D > 0$  mają odmienny charakter.

W kontekście dodatniego niedopasowania hydrofobowego, proces dimeryzacji inkluzji jest faworyzowany przez wkład dyspersyjny. Jest to rezultatem zwiększenia długości hydrofobowej inkluzji, co równocześnie prowadzi do wzrostu powierzchni kontaktu inkluzji w stanie dimerycznym.



**A****B**

**Rys. 4.11:** Zmiany energii swobodnej towarzyszące dimeryzacji inkluzji ( $\Delta G_{ca\ddot{a}k}$ ), wraz z dekompozycją na wkład dyspersyjny ( $\Delta G_{dysp}$ ) i elektrostatyczny ( $\Delta G_{el}$ ) (A), a także dekompozycją ze względu na poszczególne komponenty układu (i — inkluzja, b — błona, w — woda) (B). Linie ciągłe przedstawiają trendy zmian  $\Delta G_{ca\ddot{a}k}$ ,  $\Delta G_{dysp}$  i  $\Delta G_{el}$  wraz z wzrostem  $\Delta D$ . Strzałki przedstawione po prawej stronie pomagają określić, jakiemu stanowi sprzyjają poszczególne wkłady do  $\Delta G$ .

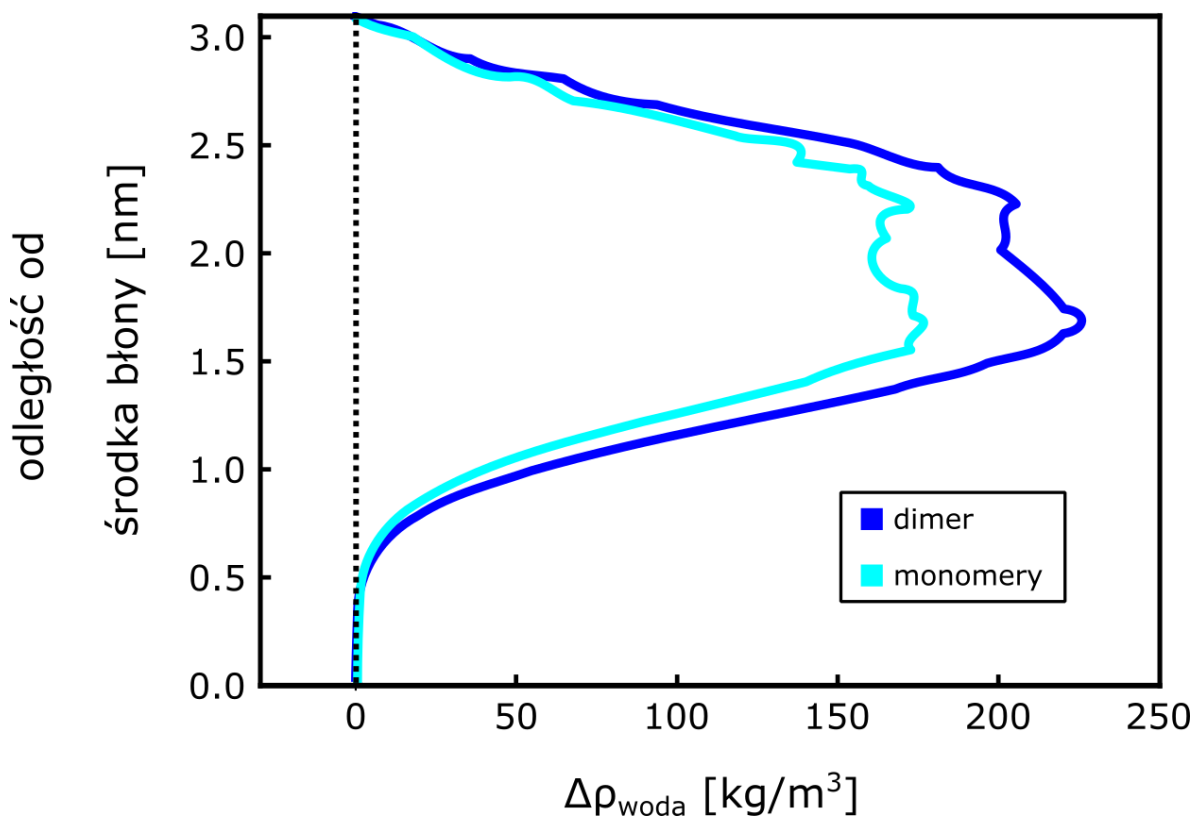
Z kolei, w przypadku ujemnego niedopasowania hydrofobowego, za stabilność dimerów odpowiada wkład elektrostatyczny, związany w szczególności z oddziaływaniami cząsteczek wody z błoną w sąsiedztwie inkluzji. Wyznaczone przeze mnie wkłady



pochodzące od oddziaływań z udziałem lipidów błonowych ( $\Delta G_{i-b}$  na Rys. 4.11B) wyniosły odpowiednio  $-73.4$  kcal/mol dla  $\Delta D = -0.6$  nm oraz  $-66.7$  kcal/mol dla  $\Delta D = 0.0$  nm. Dodatkowo, zaobserwowałem również ujemne wartości wkładów pochodzących od oddziaływań z udziałem wody ( $\Delta G_{i-w}$ ), które wyniosły odpowiednio  $-270.9$  kcal/mol i  $-261.6$  kcal/mol. Oznacza to, że zarówno wkład pochodzący od wody jak i ten od lipidów sprzyjają dimeryzacji, jednak to ten pierwszy jest dominujący.

Przeciwnie, wartości  $\Delta G_{i-i}$  opisujące oddziaływania między inkluzjami wynoszą odpowiednio  $339.8$  kcal/mol i  $326.7$  kcal/mol dla  $\Delta D = -0.6$  nm oraz  $\Delta D = 0.0$  nm, co wskazuje, że oddziaływania inkluzja-inkluzja nie sprzyjają dimeryzacji. Widać zatem, że oddziaływania mediowane przez cząsteczki rozpuszczalnika i lipidów kompensują silne elektrostatyczne odpychanie pomiędzy inkluzjami.

W kolejnym etapie analizy skoncentrowałem się na zrozumieniu, dlaczego wkłady  $\Delta G_{i-w}$  oraz  $\Delta G_{i-b}$  sprzyjają dimeryzacji inkluzji. W tym celu przeanalizowałem zmiany profili gęstości cząsteczek wody i grup fosforanowych w sąsiedztwie inkluzji pod wpływem ich dimeryzacji.



**Rys. 4.12:** Różnicowy profil gęstości wody wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni błony,  $\Delta\rho$ , obliczony jako różnica profili gęstości wody w sąsiedztwie inkluzji i w błonie niezaburzonej, gdy  $\Delta D = -0.6$  nm. Osobno pokazany jest stan zdysocjowany i stan dimeryczny.

Do zbadania molekularnego podłoża wkładu  $\Delta G_{i-w}$  sprzyjającego dimeryzacji (dla  $\Delta D < 0$ ) wykorzystałem analizę różnicowych profili gęstości dla  $\Delta D = -0.6$  nm, zaprezentowaną na Rys. 4.12. Dzięki tym profilom zaobserwowałem zwiększenie liczby cząsteczek

Tabela 2 Wyznaczone zmiany liczby nadmiarowych cząsteczek wody w odpowiedzi na dimeryzację inkluzji dla różnych wartości niedopasowania hydrofobowego.

$\Delta D$ [nm]	$\Delta H_2O_{\text{monomer}}$ [-]	$\Delta H_2O_{\text{dimer}}$ [-]	$\Delta H_2O$ [-]
-0.6	$388 \pm 5$	$297 \pm 5$	$-91 \pm 7$
0.0	$209 \pm 2$	$177 \pm 5$	$-33 \pm 5$
0.4	$48 \pm 2$	$59 \pm 4$	$11 \pm 4$
0.9	$-18 \pm 5$	$-10 \pm 2$	$7 \pm 5$

wody w kontakcie z błoną w otoczeniu inkluzji, co stanowi – jak wcześniej dyskutowałem – główny koszt energetyczny towarzyszący tworzeniu ujemnego niedopasowania hydrofobowego. Zauważyłem również, że w otoczeniu dimeru mamy do czynienia z nawet nieco większą gęstością wody. Jednak ze względu na mniejszy obszar błony zaburzany przez dimer w stosunku do sumarycznego obszaru zaburanego przez dwa monomery, można się spodziewać, że liczba nadmiarowych cząsteczek wody będących w kontakcie z błoną jest mniejsza w stanie dimerycznym. By te przewidywania zweryfikować ilościowo, wyznaczyłem zmianę liczby nadmiarowych cząsteczek wody ( $\Delta H_2O$ ) w kontakcie z błoną towarzyszącą procesowi dimeryzacji, zgodnie ze wzorem 4.1:

$$\Delta H_2O = \Delta H_2O_{\text{dimer}} - \Delta H_2O_{\text{monomer}}, \quad (4.1)$$

gdzie  $\Delta H_2O_{\text{dimer}}$  i  $\Delta H_2O_{\text{monomer}}$  oznaczają liczbę nadmiarowych cząsteczek wody względem błony niezaburzonej (bez inkluzji), odpowiednio w przypadku dimeru oraz monomerów.

Wyniki przedstawione w Tabeli 2 ukazują, że w przypadku ujemnego niedopasowania hydrofobowego ( $\Delta D = -0.6$  nm) proces dimeryzacji prowadzi do zmniejszenia liczby nadmiarowych cząsteczek wody w kontakcie z błoną o  $91 \pm 7$ . Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi wnioskami (z podrozdziału 4.2.2), które wskazywały, że błony zaburzone obecnością inkluzji dążą do osiągnięcia stanu, w którym minimalizowany jest niekorzystny kontakt między wodą a błoną. Przeprowadzona analiza wykazuje, że dimeryzacja inkluzji przy ujemnym  $\Delta D$  przynosi korzyści energetyczne poprzez zmniejszenie liczby nadmiarowych cząsteczek wody, co jest zgodne z ujemną wartością  $\Delta G_{i-w}$  przedstawioną na Rys. 4.11B.

W przypadku, gdy  $\Delta D$  przyjmuje wartość zero, również zaobserwowałem redukcję liczby nadmiarowych cząsteczek wody ( $\Delta H_2O = -33 \pm 5$ ), jednak jest ona znacznie mniejsza niż w sytuacji, gdy  $\Delta D = -0.6$  nm ( $\Delta H_2O = -91 \pm 7$ ). To z kolei tłumaczy mniejszą stabilność dimerów oraz mniejszy wkład  $\Delta G_{i-w}$  w porównaniu do przypadku ujemnego  $\Delta D$ .

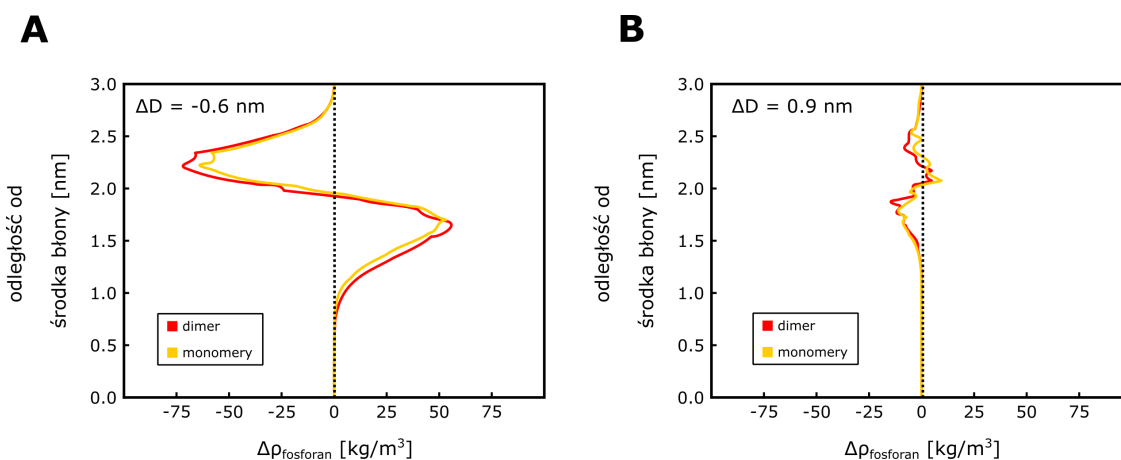
Natomiast dla sytuacji dodatniego niedopasowania hydrofobowego ( $\Delta D$  równego 0.4 oraz 0.9 nm), obserwujemy odmienną tendencję: niewielki wzrost liczby nadmiarowych cząsteczek wody (odpowiednio o  $11 \pm 4$  i  $7 \pm 5$  cząsteczek). Uzyskany wynik potwierdza wcześniejsze wnioski (Rys. 4.11A), wskazujące, że dimeryzacji inkluzji przy dodatnim  $\Delta D$  nie sprzyja wkład elektrostatyczny, co potwierdza brak istotnego spadku liczby kontaktów między wodą a błoną w sąsiedztwie inkluzji.

Tabela 3 Zmiany liczby nadmiarowych cząsteczek wody w odpowiedzi na dimeryzację inkluzji przy  $\Delta D = 1.4$  nm przy dwóch różnych orientacjach inkluzji: przechylonej i pionowej.

orientacja	$\Delta H_2O_{\text{monomer}}$ [-]	$\Delta H_2O_{\text{dimer}}$ [-]	$\Delta H_2O$ [-]
przechylona	$-188 \pm 21$	$-83 \pm 1$	$106 \pm 21$
pionowa	$-192 \pm 8$	$-116 \pm 3$	$76 \pm 8$

Zadałem sobie również pytanie, czy zwiększona stabilność dimerów przy  $\Delta D > 0$ , wynikająca z utrzymania pionowej orientacji inkluzji, jest rezultatem zmniejszenia niekorzystnych kontaktów wody z błoną. W tym celu obliczyłem  $\Delta H_2O$  dla inkluzji o  $\Delta D = 1.4$  nm, zarówno w przypadku, gdy inkluzja miała orientację przechyloną, jak i gdy utrzymano jej orientację pionową.

Analizując wyniki przedstawione w Tabeli 3, można zauważyć, że w przypadku, gdy inkluzja była przechylona, proces dimeryzacji skutkowało zwiększeniem liczby nadmiarowych cząsteczek wody o  $105 \pm 21$ . Natomiast, gdy utrzymywano pionową orientację inkluzji, proces dimeryzacji prowadził do wzrostu liczby nadmiarowych cząsteczek wody o  $76 \pm 8$ . Wnioskujemy z tego, że utrzymanie pionowej orientacji inkluzji prowadzi do zmniejszenia  $\Delta H_2O$ , a więc dodatkowo wpływając na stabilność dimerów (co koresponduje z wynikami zaprezentowanymi na Rys. 4.7).



Rys. 4.13: Różnicowe profile gęstości grup fosforanowych dla dimeryzacji inkluzji w błonie DMPC/CHL, przy (A)  $\Delta D = -0.6$  nm oraz (B)  $\Delta D = 0.9$  nm.

Na Rys. 4.13 przedstawiłem różnicowe profile gęstości grup fosforanowych dla  $\Delta D = -0.6$  nm (A) oraz  $\Delta D = 0.9$  nm (B).

W przypadku gdy  $\Delta D = -0.6$  nm, zauważalne jest przesunięcie położenia sąsiednich fosforanów w kierunku niższych odległości od środka błony w obecności inkluzji. Możemy wnioskować, że towarzyszy temu wzmocnienie korzystnych oddziaływań inkluzja-fosforan, co pokazałem w sekcji 4.2.2. Ponadto, możemy zauważyć, że w przypadku stanu dimerycznego rearanżacja fosforanów jest nieznacznie większa, co potencjalnie tłumaczy relatywnie niewielki korzystny wkład oddziaływań inkluzja-błona ( $\Delta G_{i-b}$ ) do energii swobodnej dimeryzacji.

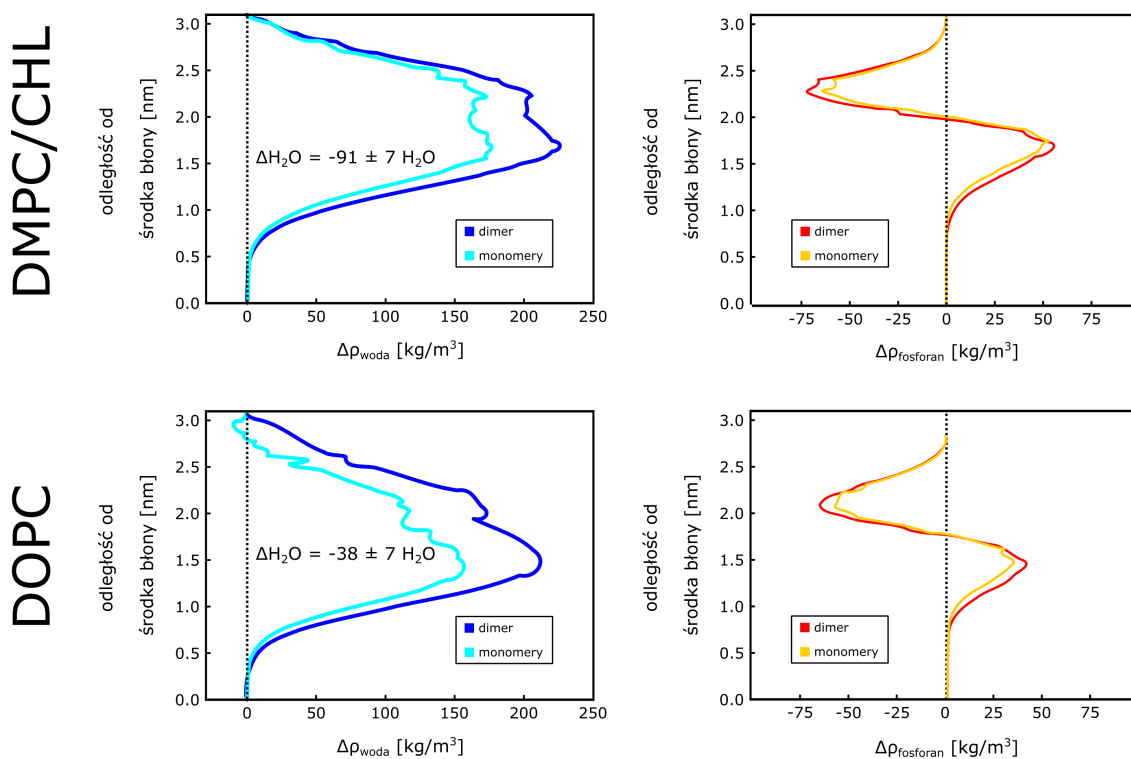




W sytuacji, gdy  $\Delta D = 0.9$  nm, nie zaobserwowałem istotnych zmian w rozkładzie fosforanów w otoczeniu inkluzji, zarówno w stanie monomerycznym jak i dimerycznym (Rys. 4.13B). Sugeruje to, że umieszczenie inkluzji przy  $\Delta D > 0$  nie prowadzi do rearanżacji fosforanów, która mogłaby sprzyjać ich asocjacji. To pozwala wyjaśnić, dlaczego oddziaływania elektrostatyczne inkluzja-błona nie sprzyjają dimeryzacji inkluzji przy  $\Delta > 0$ .

Podsumowując, analiza różnicowych gęstości wody i fosforanów w przypadku ujemnego niedopasowania hydrofobowego uwydatnia wpływ oddziaływań elektrostatycznych inkluzja-woda oraz inkluzja-błona na stabilność dimerów. Natomiast w przypadku dodatniego niedopasowania hydrofobowego głównym czynnikiem wpływającym na stabilność dimerów są oddziaływania dyspersyjne inkluzja-inkluzja.

Następnie, aby wyjaśnić na poziomie molekularnym, w jaki sposób upakowanie lipidów wpływa na dimeryzację inkluzji w wyniku ujemnego niedopasowania hydrofobowego, profile  $\Delta\rho_{\text{woda}}$  obliczyłem także dla przypadku dimeryzacji w błonie DOPC, dla której  $\Delta D = -0.6$  nm. Wyniki te porównałem z analogicznymi wynikami, uzyskanymi wcześniej dla błony DMPC/CHL (taka sama wartość  $\Delta D$ ).



**Rys. 4.14:** Różnicowe profile gęstości wody i grup fosforanowych dla dimeryzacji inkluzji w błonach DMPC/CHL i DOPC, przy  $\Delta D = -0.6$  nm. Ponadto, dla  $\Delta\rho_{\text{woda}}$  podana jest także zmiana liczby nadmiarowych cząsteczek wody ( $\Delta H_2O$ ), wyznaczoną według wzoru 4.1.

Jak widać z profili  $\Delta\rho_{\text{woda}}$  na Rys. 4.14, monomeryczne inkluzje wywołują mniejsze zaburzenie lipidów w błonie nieuporządkowanej niż w uporządkowanej. Wskazują na to różnice w wysokościach błękitnych pików pomiędzy dwoma typami błon. Natomiast dla stanu dimerycznego (oznaczonego kolorem niebieskim), wielkości pików są zbliżone, co

wskazuje na podobne zaburzenie lipidów w obu błonach. Ponadto, wyznaczona zmiana liczby nadmiarowych cząsteczek wody w procesie dimeryzacji ( $\Delta H_2O$ ) w błonie DOPC wyniosła  $-38 \pm 7$ . Oznacza to, że dimeryzacji inkluzji w błonie nieuporządkowanej towarzyszy uwolnienie mniejszej liczby cząsteczek wody w porównaniu do błony uporządkowanej (dla której uzyskałem poprzednio wartość  $\Delta H_2O = -91 \pm 7$ ).

Analizując wielkości dodatnich pików na profilach  $\Delta\rho_{\text{fosforan}}$  dla obu błon (Rys. 4.14), można zaobserwować, że dimeryzacji inkluzji w błonie nieuporządkowanej towarzyszy mniejszy wzrost kontaktów inkluzja-fosforan w porównaniu do błony uporządkowanej.

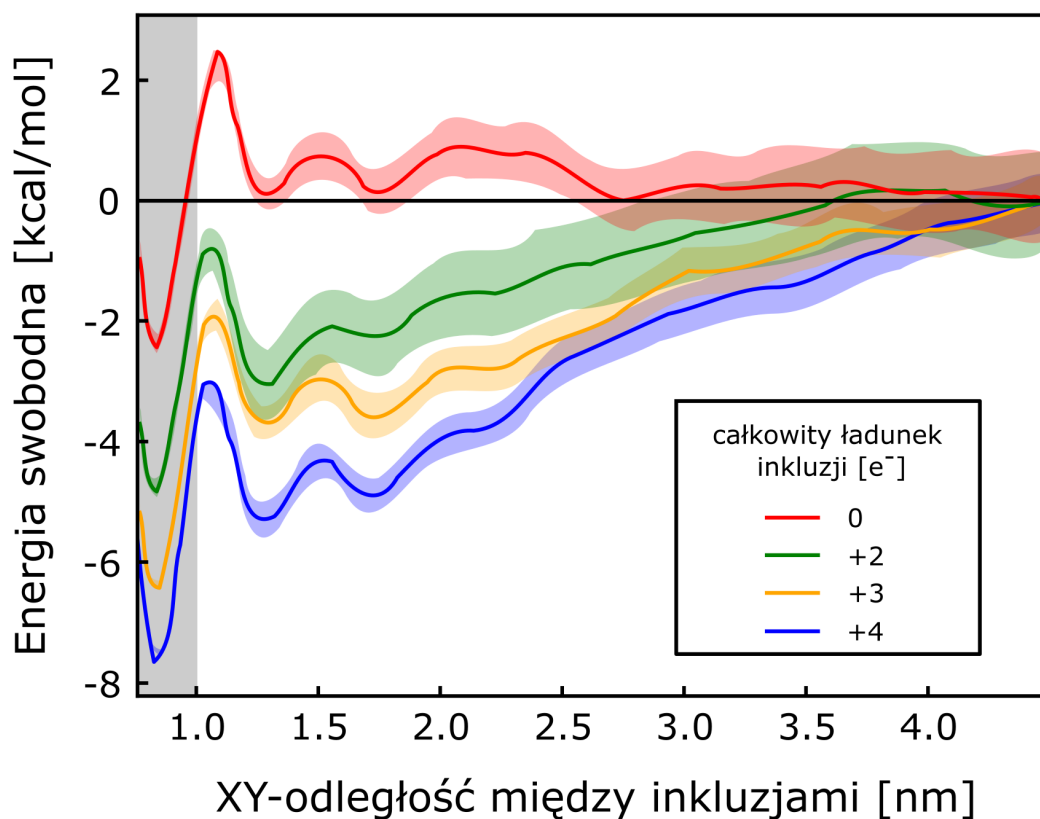
Podsumowując, ustaliłem że kluczowym czynnikiem napędzającym dimeryzację przy ujemnym  $\Delta D$  jest wkład  $\Delta G_{i-w}$  wynikający z minimalizacji niekorzystnych oddziaływań pomiędzy wodą a lipidami w sąsiedztwie inkluzji. Rzeczywiście, całkowanie profili  $\Delta\rho$  wykazało, że w procesie dimeryzacji inkluzji następuje zmniejszenie liczby nadmiarowych cząsteczek wody w kontakcie z błoną. Wyznaczone energie swobodną dimeryzacji pozwoliły z kolei ustalić, że dimery w błonie uporządkowanej charakteryzują się większą stabilnością w porównaniu do błony nieuporządkowanej. Wynika to z faktu, że dimeryzacja inkluzji w błonie uporządkowanej wiąże się z większym spadkiem liczby nadmiarowych cząsteczek wody.

#### 4.3.5 W jaki sposób ładunek inkluzji wpływa na ich dimeryzację?

Dotychczasowe wyniki uzyskane przeze mnie potwierdzają istotny wpływ oddziaływań elektrostatycznych, w szczególności tych z udziałem cząsteczek rozpuszczalnika w sąsiedztwie inkluzji, na proces dimeryzacji. W związku z tym postawiłem dalej pytanie, w jakim stopniu stabilność dimerów zależy od wielkości i znaku ładunku inkluzji. Odpowiada to np. zmianie liczby reszt zasadowych i/lub kwaśnych w sekwencji peptydu transbłonowego.

Aby odpowiedzieć na to pytanie, wyznaczyłem profile energii swobodnej opisujące dimeryzację inkluzji o ładunkach netto równych: 0, +2, +3 i +4e<sup>-</sup>, w obecności ujemnego niedopasowania hydrofobowego ( $\Delta D = -0.6$  kcal/mol). W celu utrzymania inkluzji o neutralnym ładunku (0e<sup>-</sup>) w orientacji prostopadłej do powierzchni błony, zastosowałem dodatkowy potencjał usztywniający (opisany w podrozdziale 3.7.1). Obliczenia te zostały przeprowadzone dla układu zawierającego błonę DMPC/CHL.

Analiza profili energii swobodnej przedstawionych na Rys.4.15 jednoznacznie wskazuje na zmniejszenie głębokości minimum odpowiadającego stanowi dimerycznemu (XY-odległość < 1.0 nm) wraz z zmniejszaniem się ładunku inkluzji. Wynika z tego jednoznacznie, że pomimo wzrostu odpychania elektrostatycznego pomiędzy inkluzjami, zwiększający się ładunek sprzyja stabilności dimerów. Ponadto, zauważalne jest, że krzywe opisujące proces dimeryzacji inkluzji o sumarycznym ładunku +3e<sup>-</sup> i +4e<sup>-</sup> wykazują niezerowe nachylenie w szerokim zakresie współrzędnej reakcji i wypłaszczają się dopiero dla odległości większych niż 4.5 nm. Dla ładunku 2e<sup>-</sup> nachylenie profilu jest wyraźnie mniejsze,

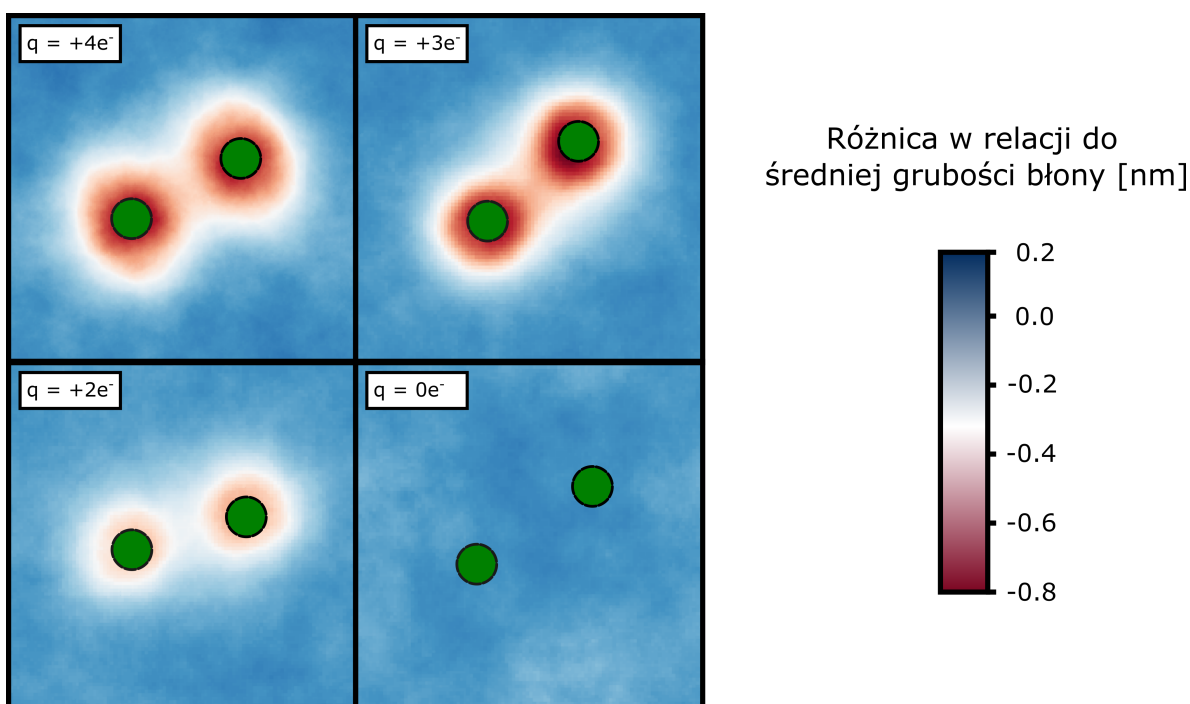


Rys. 4.15: Zależność profili energii swobodnej dla dimeryzacji inkluzji w błonie DMPC/CHL od ich całkowitego ładunku ( $\Delta D = -0.6$  nm). Zaznaczony na szaro zakres współrzędnej reakcji odpowiada stanowi dimerycznemu inkluzji.

a w przypadku  $0e^-$  krzywa nie wykazuje żadnego istotnego nachylenia w całym badanym zakresie. Wskazuje to na brak dalekozasięgowych sił prowadzących do dimeryzacji neutralnych inkluzji. Uzyskane przeze mnie wyniki sugerują, że całkowity ładunek inkluzji wpływa na stopień zaburzenia lipidów w otoczeniu inkluzji, co z kolei przekłada się na zmianę liczby niekorzystnych kontaktów wody z błoną w otoczeniu inkluzji. W celu zweryfikowania tych przewidywań, przeprowadziłem analizę lokalnej grubości błony wokół inkluzji dla każdego z powyższych przypadków.

Zaprezentowane na Rys. 4.16 mapy lokalnej grubości błony ukazują, że inkluzje o ładunku +3 i +4 powodują utworzenie największych obszarów ścienienia błony. Dla ładunku  $q = 2e^-$  obserwujemy spadek stopnia zaburzenia błony. W przypadku inkluzji o neutralnym ładunku elektrycznym nie obserwujemy istotnych zmian w lokalnej grubości błony. Zauważamy zatem, że zwiększające się naładowanie inkluzji prowadzi do większego stopnia zaburzenia błony. Szczególnie warto podkreślić, że dla  $q = 0e^-$  stopień zaburzenia błony jest znikomy, co wyjaśnia brak sił dalekozasięgowych prowadzących do asocjacji inkluzji.

Zgodnie z wcześniejszymi wynikami, dimery inkluzji są tym bardziej stabilne, im większy jest spadek liczby kontaktów między cząsteczkami wody a błoną na skutek



Rys. 4.16: Zależność lokalnej grubości błony DMPC/CHL wokół inkluzji ( $\Delta D = -0.6$  nm) od sumarycznego ładunku inkluzji, przy XY-odległości wynoszącej 3.7 nm. Skala kolorów reprezentuje różnice pomiędzy lokalną grubością błony a jej średnią grubością w stanie niezaburzonym.

Tabela 4 Wyznaczone zmiany liczby nadmiarowych cząsteczek wody w odpowiedzi na dimeryzację inkluzji, gdy  $\Delta D = -0.6$  nm, w zależności od jej naładowania.

$q[e^-]$	$\Delta H_2O_{\text{monomer}} [-]$	$\Delta H_2O_{\text{dimer}} [-]$	$\Delta H_2O [-]$
+4	$388 \pm 5$	$297 \pm 5$	$-91 \pm 7$
+3	$311 \pm 8$	$248 \pm 2$	$-63 \pm 8$
+2	$226 \pm 7$	$194 \pm 6$	$-32 \pm 9$
0	$2 \pm 5$	$-4 \pm 4$	$-6 \pm 7$

dimeryzacji. W związku z powyższymi obserwacjami zadałem pytanie, jak zmienia się liczba nadmiarowych cząsteczek wody ( $\Delta H_2O$ ) w procesie dimeryzacji inkluzji w zależności od ich naładowania. Wyniki przedstawione w Tabeli 4 pokazują, że dimeryzacji inkluzji o naładowaniu  $q = +3e^-$  towarzyszy spadek liczby nadmiarowych cząsteczek wody o  $63 \pm 8$ . Dalsze zmniejszanie naładowania inkluzji (odpowiednio do  $q = +2$  i  $0e^-$ ) skutkuje uzyskaniem wartości  $\Delta H_2O$  wynoszących odpowiednio  $-32 \pm 9$  oraz  $-6 \pm 7$ . Możemy zatem wywnioskować, że wraz ze zmniejszaniem naładowania inkluzji maleje korzyść wynikająca z uwalniania nadmiarowych cząsteczek wody w wyniku dimeryzacji inkluzji.

Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na nietrywialny i nieintuicyjny wpływ naładowania inkluzji na stabilność dimerów. Można by mianowicie oczekiwać, że wzrost ładunku inkluzji będzie prowadził do destabilizacji dimerów w wyniku elektrostatycznego odpychania. W rzeczywistości obserwujemy jednak odwrotny trend: zwiększenie ładunku prowadzi do wzrostu stabilności dimerów. Ustaliłem, że obserwowany trend jest powiązany z różnicami w stopniu zaburzenia błony, co z kolei wpływa na liczbę niekorzystnych kontaktów

między wodą a błoną. W przypadku dimeryzacji najsilniej naładowanych inkluzji zaobserwowałem największy spadek liczby nadmiarowych cząsteczek wody, podczas gdy w przypadku inkluzji elektrycznie obojętnej spadek ten jest marginalny. Wyniki te podkreślają wcześniej omawiany istotny wpływ oddziaływań woda-błona na mechanizm dimeryzacji inkluzji, wynikający z ujemnego niedopasowania hydrofobowego.

#### 4.3.6 Podsumowanie

Przedstawione w tym rozdziale wyniki jednoznacznie potwierdzają, że ujemne niedopasowanie hydrofobowe sprzyja stabilizacji dimerów. Z kolei dodatnie niedopasowanie hydrofobowe prowadzi raczej do ich przechylenia w błonie niż do dimeryzacji. Zewnętrzne uniemożliwienie przechylenia inkluzji znacząco zwiększa stabilność dimerów w sytuacji dodatniego niedopasowania.

Moje wyniki wskazują, że w przypadku ujemnego niedopasowania hydrofobowego istotną rolę w stabilizacji stanu dimerycznego odgrywa wkład elektrostatyczny. Zaobserwowałem, że proces dimeryzacji inkluzji wiąże się ze zmniejszeniem niekorzystnych kontaktów między wodą a błoną w sąsiedztwie inkluzji, przy czym ten spadek jest tym bardziej wyraźny, im silniejsze jest ujemne niedopasowanie hydrofobowe. Ponadto, wykazałem, że oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy inkluzją a resztą błony sprzyjają procesowi dimeryzacji, jednakże w mniejszym stopniu niż oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy cząsteczkami wody a błoną.

W przypadku dodatniego niedopasowania hydrofobowego zaobserwowałem, że inkluzje wykazują tendencję do zmiany swojej orientacji, co prowadzi do zmniejszenia ich efektywnej długości hydrofobowej. W efekcie dimeryzacji inkluzji przy dodatnim niedopasowaniu hydrofobowym nie towarzyszy korzyść związana z uwolnieniem nadmiarowych cząsteczek wody. Badania wykazały również, że w przeciwieństwie do ujemnego niedopasowania hydrofobowego, dimeryzacji inkluzji przy dodatnim niedopasowaniu hydrofobowym nie sprzyjają oddziaływania elektrostatyczne. Jednakże, ze względu na zwiększenie powierzchni kontaktu między inkluzjami, stan dimeryczny jest stabilizowany przez wkład dyspersyjny.

Opierając się na teorii napięcia liniowego, pokazałem, że przy silnie ujemnym niedopasowaniu hydrofobowym pomiędzy dwoma odseparowanymi monomerami w błonie uporządkowanej występują dalekozasięgowe siły sprzyjające asocjacji. Są one mediowane przez cząsteczki lipidów i wynikają z dążności układu do zmniejszenia stopnia zaburzenia błony i tym samym ograniczenia kontaktów pomiędzy wodą a błoną.

Dodatkowo, pokazałem, że dimeryzacja inkluzji w błonie uporządkowanej jest skorelowana z większym uwolnieniem cząsteczek wody w porównaniu do błony nieuporządkowanej. To tłumaczy, dlaczego dimery inkluzji są bardziej stabilne w błonie uporządkowanej niż w nieuporządkowanej.

Zaobserwowałem także, że wzrost naładowania inkluzji nieoczekiwanie przyczynia się do zwiększenia stabilności stanu dimerycznego. Wykazałem, że wynika to z faktu, że zwiększeniu naładowania inkluzji towarzyszy wzrost stopnia zaburzenia błony, co z kolei skutkuje zwiększeniem niekorzystnych kontaktów między wodą a błoną. W rezultacie, w procesie dimeryzacji inkluzji dochodzi do uwolnienia tym większej liczby nadmiarowych cząsteczek wody, im wyższe jest naładowanie inkluzji.

#### **4.4 Niedopasowanie hydrofobowe a segregacja inkluzji między domenami o różnym stopniu uporządkowania**

Jednym z możliwych sposobów minimalizacji niedopasowania hydrofobowego jest segregacja inkluzji między domenami błonowymi o różnej grubości. Efekt ten polega na przeniesieniu inkluzji do domeny, w której jej długość hydrofobowa jest lepiej dopasowana do grubości błony. Ten mechanizm został zaobserwowany m.in. w badaniach nad peptydami segregowanymi pomiędzy siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego [41]. Z drugiej strony ustalono także, że większość inkluzji preferencyjnie lokalizuje się w nieuporządkowanych domenach błonowych ( $L_D$ ) [43–46]. Przeniesienie inkluzji z domen uporządkowanych ( $L_O$ ) do domen  $L_D$  jest zwykle wypadkowo korzystne, pomimo pojawiającego się kosztu energetycznego związanego z wytworzeniem niedopasowania hydrofobowego w domenach  $L_D$  o mniejszej grubości [46]. Badania sugerują również, że za ten proces odpowiedzialny jest wkład entalpowy, wynikający z tworzenia bardziej korzystnych oddziaływań między inkluzją a lipidami w mniej upakowanych błonach [46].

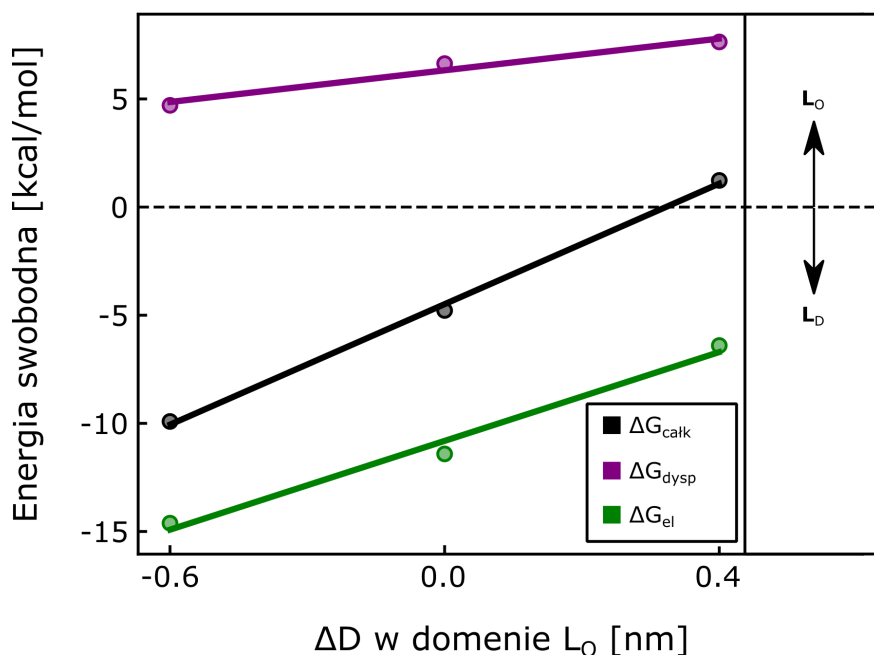
W związku z powyższym, postanowiłem ustalić wpływ niedopasowania hydrofobowego na proces transferu inkluzji między domenami o różnym uporządkowaniu. Moim celem było w szczególności dostarczenie molekularnego opisu procesu segregacji inkluzji z identyfikacją oddziaływań sprzyjających przeniesieniu inkluzji do domeny  $L_D$ , a także tych, które skłaniają inkluzję do pozostawania w domenie  $L_O$ .

##### **4.4.1 Energetyka procesu segregacji inkluzji między domenami błonowymi w zależności od niedopasowania hydrofobowego**

Do zbadania zmian energii swobodnej towarzyszących przeniesieniu inkluzji z domeny uporządkowanej do nieuporządkowanej zastosowałem podejście alchemiczne (patrz: podrozdział 3.7.1). W badaniach wykorzystałem model dwuwarstwy lipidowej obejmujący dwie domeny:  $L_O$ , złożoną z lipidów DMPC i cholesterolu o stężeniu 30% mol (DMPC/CHL) oraz  $L_D$ , złożoną z lipidów DOPC. Badałem inkluzje o trzech różnych długościach, odpowiadających wartościom  $\Delta D$  w błonie DMPC/CHL odpowiednio:  $-0.6$ ,  $0.0$  i  $0.4$  nm.

Wyniki, które zostały przedstawione na Rys. 4.17, dostarczają cennych informacji na temat segregacji inkluzji między domenami błonowymi w zależności od wartości  $\Delta D$ . W przypadku, gdy  $\Delta D = -0.6$  nm przeniesieniu inkluzji z domeny DMPC/CHL do DOPC towarzyszy zmiana energii swobodnej  $\Delta G_{\text{całk}} = -9.9$  kcal/mol. W miarę zwiększania się





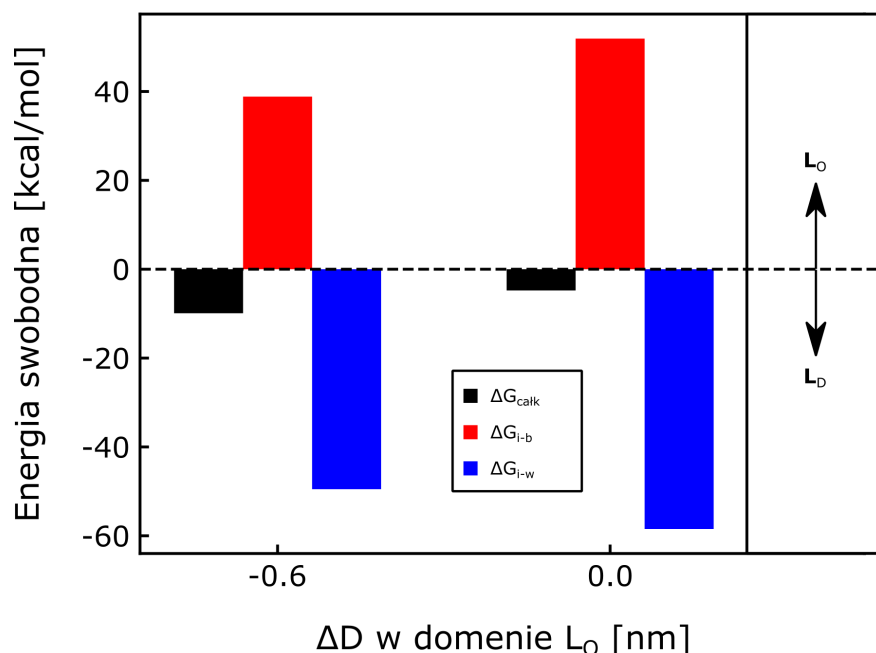
**Rys. 4.17:** Energia swobodna przeniesienia inkluzji z domeny uporządkowanej do nieuporządkowanej,  $\Delta G_{całk}$  (czarny). Dodatkowo wartość  $\Delta G_{całk}$  rozłożona jest na wkłady wynikające z oddziaływań elektrostatycznych,  $\Delta G_{el}$  (zielony), oraz oddziaływań dyspersyjnych, ( $\Delta G_{dysp}$ ) (fioletowy). Trendy zmian całkowitej energii swobodnej przeniesienia oraz jej wkładów w zależności od  $\Delta D$  w błonie uporządkowanej są zaznaczone ciągłymi liniami. Strzałki przedstawione po prawej stronie pomagają określić, przeniesieniu do jakiej domeny sprzyjają poszczególne wkłady do  $\Delta G$ .

$\Delta D$ , wartość  $\Delta G_{całk}$  rośnie, uzyskując odpowiednio  $-4.8$  kcal/mol dla zerowego  $\Delta D$  oraz  $1.2$  kcal/mol dla  $\Delta D = 0.4$  nm. Można zatem skonkludować, że ujemne niedopasowanie hydrofobowe sprzyja przeniesieniu inkluzji do domeny  $L_D$ , podczas gdy dodatnie niedopasowanie hydrofobowe sprzyja przeniesieniu inkluzji do domeny  $L_O$ .

Dekompozycja  $\Delta G_{całk}$  (Rys. 4.17) ujawnia, że przeniesieniu inkluzji z domeny  $L_O$  do  $L_D$  sprzyja przede wszystkim wkład elektrostatyczny,  $\Delta G_{el}$ , który jest tym korzystniejszy (ujemny) im bardziej ujemna jest wartość  $\Delta D$ . Przeniesieniu inkluzji do domeny  $L_D$  przeciwdziała z kolei wkład dyspersyjny,  $\Delta G_{dysp}$ , którego wartość jest tym bardziej niekorzystna (dodatnia) im większe jest  $\Delta D$ .

Na tej podstawie możemy stwierdzić, że w procesie transferu inkluzji pomiędzy błonowymi domenami o różnym uporządkowaniu odgrywają rolę dwa konkurencyjne efekty: oddziaływania elektrostatyczne sprzyjające transferowi inkluzji do domeny  $L_D$  i oddziaływania dyspersyjne, które promują przeniesienie inkluzji do domeny  $L_O$ . Kierunek spontanicznego transferu jest zatem zależny od tego, który z tych czynników jest dominujący w danej sytuacji.

Następnie przeprowadziłem alternatywną dekompozycję  $\Delta G_{całk}$  w celu wyodrębnienia wkładów pochodzących od oddziaływań między inkluzją a błoną (i–b) oraz między inkluzją a wodą (i–w). Dekompozycję przeprowadziłem zarówno dla przypadków ujemnego, jak i zerowego  $\Delta D$ . Wyniki przedstawione na Rys. 4.18 wskazują, że oddziaływania między



**Rys. 4.18:** Energia swobodna przeniesienia inkluzji z domeny uporządkowanej do nieuporządkowanej (czarny). Całkowita energia swobodna rozłożona jest na wkłady wynikające z oddziaływań inkluzji z błoną (czerwony) lub wodą (niebieski). Strzałki przedstawione po prawej stronie pomagają określić, przeniesieniu do jakiej domeny sprzyjają poszczególne wkłady do  $\Delta G$ . Wyróżnione elementy układu oznaczono symbolami: i — inkluzja, b — błona, w — rozpuszczalnik (woda).

inkluzją a lipidami hamują przeniesienie inkluzji do domeny  $L_D$ . Potwierdzają to uzyskane wartości  $\Delta G_{i-b}$  wynoszące odpowiednio 39.9 i 51.9 kcal/mol dla przypadków ujemnego i zerowego  $\Delta D$ . Z kolei oddziaływania z udziałem inkluzji i wody sprzyjają przeniesieniu inkluzji do domeny  $L_D$ , co ilustrują wartości odpowiednio  $-49.5$  i  $-58.5$  kcal/mol.

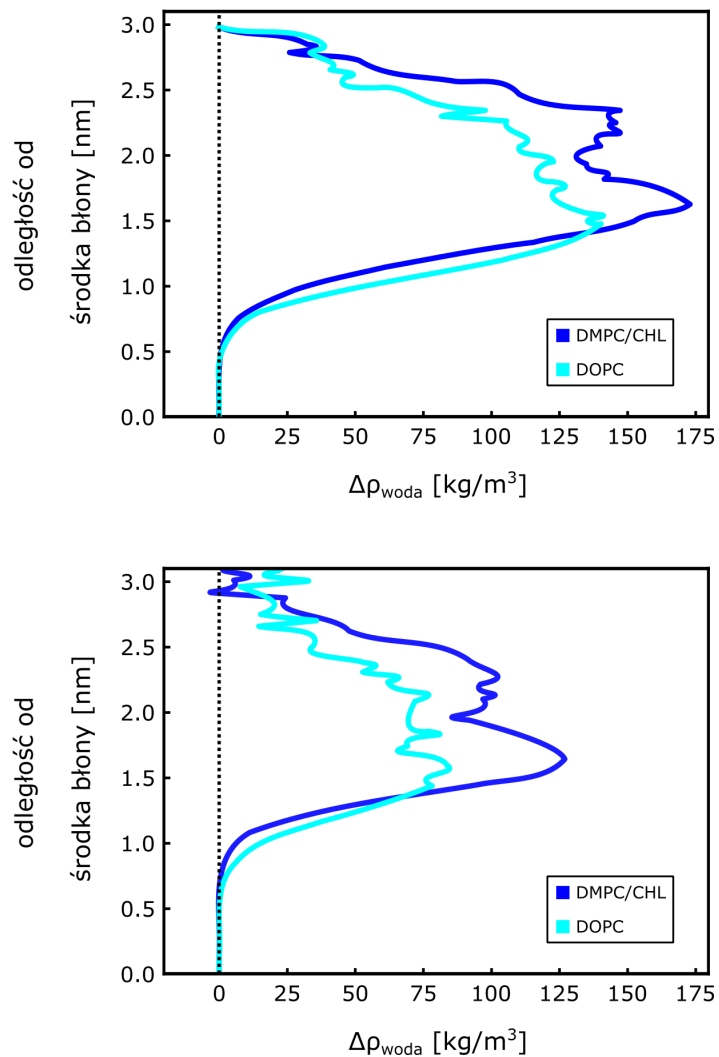
#### 4.4.2 Analiza rozkładu cząsteczek rozpuszczalnika i lipidów w otoczeniu inkluzji

Uzyskane wyniki wskazują, że segregacja inkluzji między domenami błonowymi jest kontrolowana przez dwie, przeciwne działające siły napędowe: i) oddziaływania elektrostatyczne z udziałem cząsteczek wody, promujące lokalizację w obrębie domeny nieuporządkowanej ( $L_D$ ), oraz ii) oddziaływania z udziałem cząsteczek lipidów, które sprzyjają lokalizacji w domenie uporządkowanej ( $L_0$ ).

W celu głębszego zbadania udziału wody w segregacji inkluzji pomiędzy domenami błonowymi o różnym uporządkowaniu, przeprowadziłem analizę różnicowych profili gęstości wody w sąsiedztwie inkluzji.

Na Rys. 4.19 przedstawiłem profile  $\Delta\rho$  dla wody w otoczeniu inkluzji w obu domenach błonowych. Jak można zauważyć, obecność inkluzji w domenie uporządkowanej prowadzi do silniejszego zwiększenia liczby kontaktów między wodą a błoną niż ma to miejsce w domenie nieuporządkowanej. Przeniesienie inkluzji z domeny  $L_0$  do domeny  $L_D$  skutkuje zatem zmniejszeniem liczby niekorzystnych kontaktów między wodą a błoną.

$\Delta D = 0 \text{ nm}$ 
 $\Delta D = -0.6 \text{ nm}$

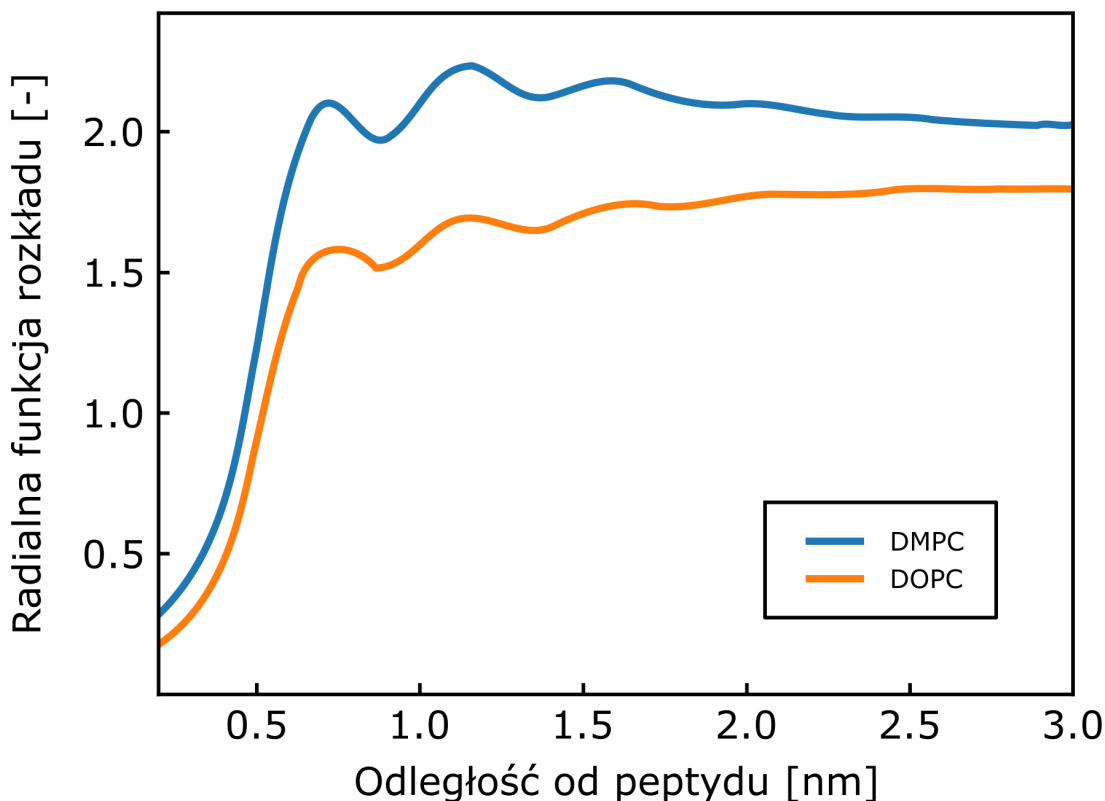


**Rys. 4.19:** Różnicowy profil gęstości wody wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni błony,  $\Delta\rho$ , obliczony jako różnica profili gęstości wody w sąsiedztwie inkluzji i w błonie niezaburzonej, gdy  $\Delta D$  w błonie uporządkowanej wynosi 0 nm lub  $-0.6$  nm. Osobno pokazane są profile, gdy inkluzja znajduje się w domenie uporządkowanej (oznaczonej jako DMPC/CHL) oraz w domenie nieuporządkowanej (DOPC).

Ten efekt jest szczególnie wyraźny w przypadku bardziej ujemnych wartości  $\Delta D$ . Otrzymane przeze mnie wyniki są spójne z wyznaczonymi wartościami wkładów  $\Delta G_{i-w}$  (patrz: Rys. 4.18), co potwierdza, że przeniesieniu inkluzji do domeny  $L_D$  sprzyjają głównie oddziaływania z udziałem inkluzji i wody.

W celu zbadania roli lipidów w segregacji inkluzji między domenami błonowymi o różnym stopniu uporządkowania, przeprowadziłem analizę radialnych funkcji rozkładu lipidów DMPC i DOPC w otoczeniu inkluzji. Rys. 4.20 pokazuje, że rozkład lipidów DMPC osiąga znacznie wyższe wartości niż rozkład lipidów DOPC. Sugeruje to, że inkluzja nawiązuje więcej kontaktów z lipidami reprezentującymi domenę  $L_O$  niż z lipidami reprezentującymi domenę  $L_D$ . Otrzymane rozkłady potwierdzają, że przeniesieniu inkluzji do domeny  $L_O$  sprzyjają głównie oddziaływania dyspersyjne, co jest zgodne z wynikami  $\Delta G_{dysp}$  przed-

stawionymi na Rys. 4.17. Te zaś z kolei wynikają przede wszystkim z oddziaływań inkluzja-błona, co potwierdzają wyniki  $\Delta G_{i-b}$  na Rys. 4.18.



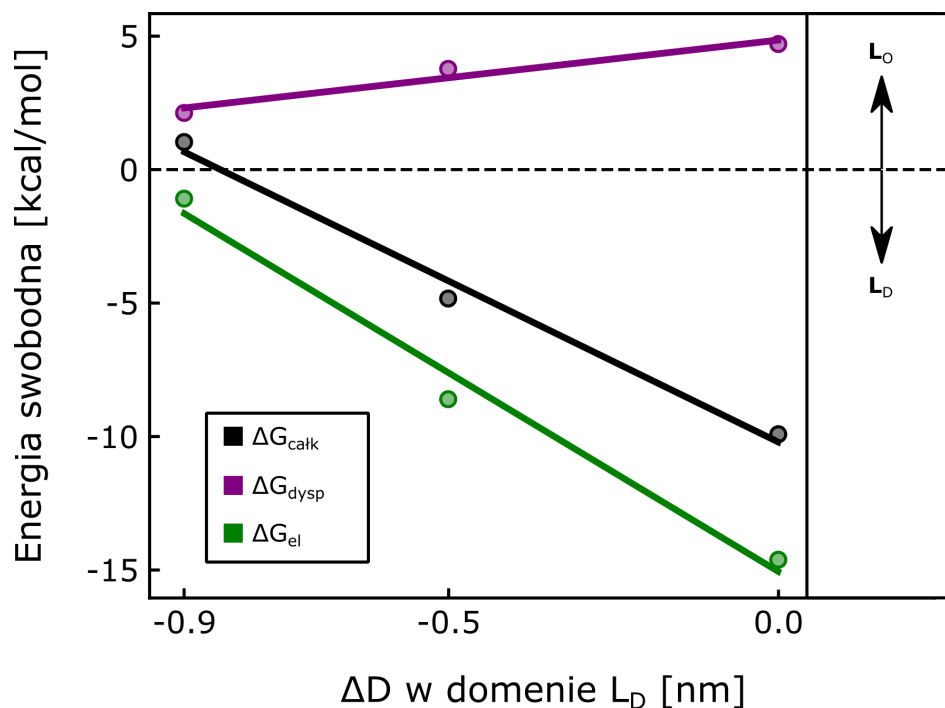
Rys. 4.20: Różnicowy profil gęstości wody wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni błony,  $\Delta\rho$ , obliczony jako różnica profili gęstości wody w sąsiedztwie inkluzji i w błonie niezaburzonej, gdy  $\Delta D$  w błonie uporządkowanej wynosi 0 nm lub  $-0.6$  nm. Osobno pokazane są profile, gdy inkluzja znajduje się w domenie uporządkowanej (oznaczonej jako DMPC/CHL) oraz w domenie nieuporządkowanej (DOPC).

#### 4.4.3 Kiedy inkluzje preferują domeny uporządkowane?

Uzyskane dotąd wyniki są zgodne z danymi eksperymentalnymi dostępnymi w literaturze [46, 185], gdzie zazwyczaj obserwuje się segregację inkluzji do domeny  $L_D$ . Ta domena cechuje się mniejszym upakowaniem lipidów niż domena  $L_O$ . Wykazałem także, że preferencja inkluzji do lokalizowania się w obrębie  $L_D$  jest tym silniejsza, im większe jest ujemne niedopasowanie hydrofobowe. Z drugiej strony zaobserwowałem, że w przypadku dodatniego niedopasowania hydrofobowego faworyzowana jest segregacja inkluzji do  $L_O$ , której sprzyja przede wszystkim wkład  $\Delta G_{dysp}$  (patrz: Rys. 4.17).

Postawiłem sobie zatem pytanie, czy możliwe jest zmniejszenie generalnej tendencji inkluzji do lokalizowania się inkluzji w domenie  $L_D$  poprzez wytworzenie w niej silnie ujemnego  $\Delta D$ . W celu znalezienia odpowiedzi na to pytanie, przeprowadziłem obliczenia analogiczne do tych opisanych w podrozdziale 4.4.1. Tym razem jednak do reprezentacji domeny  $L_D$  użyłem lipidów o dłuższych łańcuchach acylowych: i) DEiPC (di-20:1 PC) oraz ii) DEPC

(di-22:1 PC). Obliczenia te zostały przeprowadzone dla inkluzji, dla której  $\Delta D$  w uporządkowanej błonie wynosiło  $-0.6$  nm (zgodnie z Rys. 4.19), natomiast w błonach DOPC, DEiPC i DEPC wynosiło odpowiednio  $0.0$ ,  $-0.5$  oraz  $-0.9$  nm.



**Rys. 4.21:** Energia swobodna przeniesienia inkluzji z domeny uporządkowanej (w której niedopasowanie hydrofobowe wynosi  $-0.6$  nm) do nieuporządkowanej w zależności od  $\Delta D$  w domenie nieuporządkowanej (czarny). Całkowita energia przeniesienia inkluzji  $\Delta G_{\text{calk}}$  została także zdekomponowana na wkład od oddziaływań elektrostatycznych,  $\Delta G_{\text{el}}$  (zielony), oraz wkład od oddziaływań dyspersyjnych,  $\Delta G_{\text{dysp}}$  (fioletowy). Trendy zmian całkowitej energii swobodnej oraz jej wkładów elektrostatycznego i dyspersyjnego w zależności od  $\Delta D$  w błonie nieuporządkowanej są zaznaczone ciągłymi liniami. Strzałki przedstawione po prawej stronie pomagają określić, przeniesieniu do jakiej domeny sprzyjają poszczególne wkłady do  $\Delta G$ .

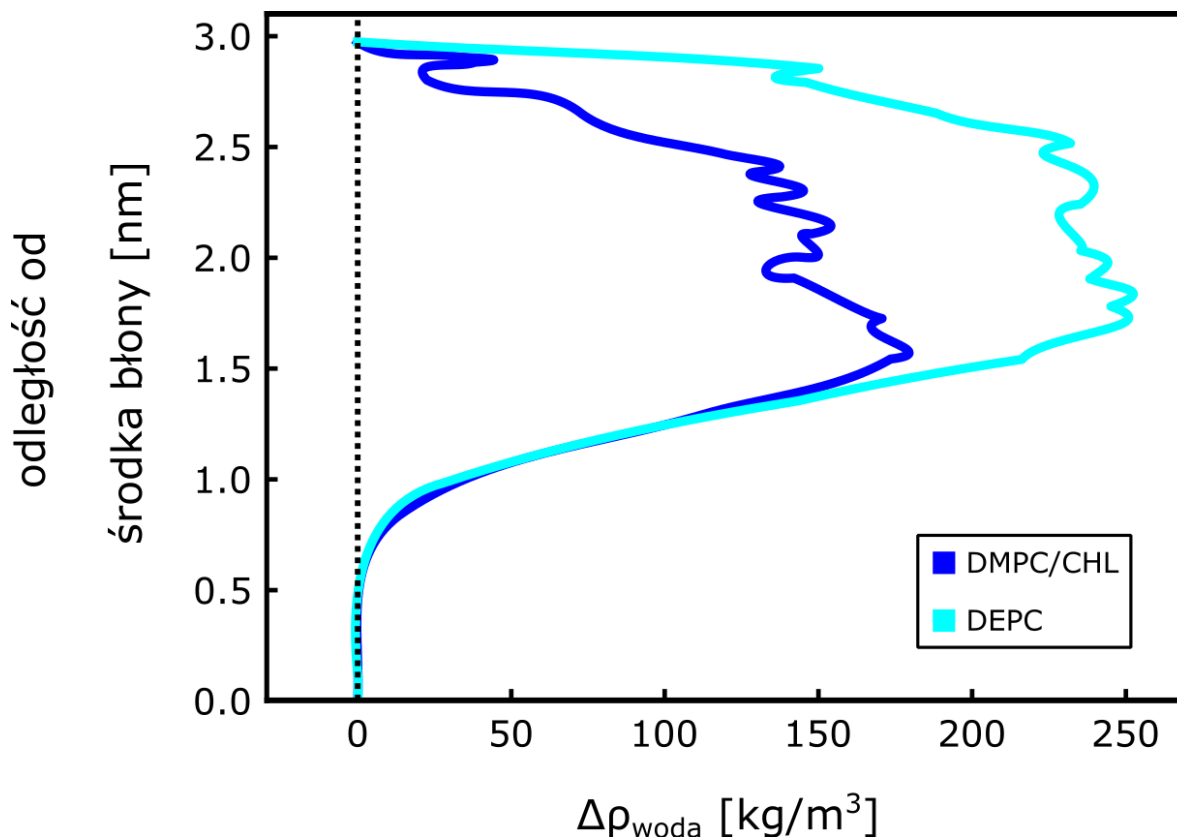
Rys. 4.21 przedstawia obliczone przeze mnie wartości energii swobodnej przeniesienia inkluzji z domeny  $L_O$  do domeny  $L_D$ , wraz z dekompozycją na wkłady wynikające z oddziaływań elektrostatycznych i dyspersyjnych. W przypadku, gdy domena  $L_D$  zbudowana była z lipidów DEiPC, o zbliżonej grubości do domeny  $L_O$ , uzyskałem wartość  $\Delta G_{\text{calk}} = -4.8$  kcal/mol. Wynik ten wskazuje, że inkluzja preferuje transfer do domeny  $L_D$  w znacznie mniejszym stopniu niż w przypadku, gdy domena  $L_D$  składa się z lipidów DOPC ( $\Delta G_{\text{calk}} = -9.9$  kcal/mol). W przypadku, gdy domenę  $L_D$  reprezentowały lipidy DEPC o jeszcze większej grubości, uzyskałem wartość  $\Delta G_{\text{calk}} = 1.0$  kcal/mol. Widzimy zatem, że silnie ujemne niedopasowanie hydrofobowe w domenie  $L_D$  może sprzyjać przeniesieniu inkluzji do domeny  $L_O$ , gdzie niedopasowanie jest mniejsze.

Moje wyniki wskazują zatem, że silnie ujemne niedopasowanie hydrofobowe w domenie  $L_D$  znacząco zmniejsza preferencję inkluzji do lokalizowania się w tej domenie na rzecz domeny  $L_O$ . Wskutek zmniejszenia preferencji, przy dostatecznie dużym niedopasowaniu w błonie  $L_D$ , może dochodzić do segregacji cząsteczek w domenie  $L_O$  pomimo większego upakowania lipidów. To jest szczególnie zauważalne, gdy grubość domeny  $L_D$  jest znacznie większa od domeny  $L_O$ , jak miało miejsce w przypadku układu DEPC-DMPC/CHL. W tym

przypadku inkluzja preferuje domenę  $L_O$ , pomimo większego upakowania lipidów w tej domenie.

Gdy spojrzymy na dekompozycję  $\Delta G_{całk}$  na składniki dyspersyjny i elektrostatyczny (Rys. 4.21), podobnie jak na Rys. 4.18, można zauważyć, że wkład  $\Delta G_{dysp}$  osiąga dodatnie wartości w każdym przypadku. Oznacza to, że wkład  $\Delta G_{dysp}$  sprzyja przeniesieniu inkluzji do domeny  $L_O$ . Z drugiej strony, wkład  $\Delta G_{el}$  przyjmuje wartości ujemne dla każdego układu, tym silniej, im bardziej ujemne jest  $\Delta D$  w domenie  $L_D$ . Stąd widać, że wkład elektrostatyczny sprzyja przeniesieniu inkluzji do domeny  $L_D$ . Dodatkowo, z wyraźnie różnych nachyleń linii trendu można zauważyć, że wkład  $\Delta G_{el}$  jest bardziej podatny na zmiany  $\Delta D$  niż wkład  $\Delta G_{dysp}$ . Sugeruje to, że istotny wpływ na zależne od  $\Delta D$  zmiany w preferowanej lokalizacji inkluzji mają oddziaływania elektrostatyczne.

Poprzednio uzyskane przeze mnie wyniki oraz dominująca rola wkładu  $\Delta G_{el}$  sugerują, że obserwowana przy  $\Delta D = -0.9$  nm (układ DEPC-DMPC/CHL) nietypowa preferencja inkluzji do lokalizowania się w domenie  $L_O$  wynika z minimalizacji liczby niekorzystnych kontaktów między wodą a błoną w sąsiedztwie inkluzji. W celu zweryfikowania tej hipotezy, wyznaczyłem różnicowe profile gęstości wody w tym układzie.



**Rys. 4.22:** Różnicowy profil gęstości wody wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni błony,  $\Delta\rho$ , obliczony jako różnica profili gęstości wody w sąsiedztwie inkluzji i w błonie niezaburzonej.  $\Delta D$  w domenie uporządkowanej wynosi  $-0.6$  nm zaś w domenie uporządkowanej  $-0.9$  nm. Osobno pokazałem profile, gdy inkluzja znajduje się w domenie uporządkowanej (oznaczonej jako DMPC/CHL) oraz w domenie nieuporządkowanej (DEPC).

Na Rys. 4.22 możemy zauważyć, że obecność inkluzji w nieuporządkowanej błonie DEPC prowadzi do zwiększenia nadmiarowej gęstości wody w sąsiedztwie błony. Ponad-





to obserwujemy, że wartość  $\Delta\rho_{\text{woda}}$  uzyskana dla nieuporządkowanej błony jest znacznie większa, niż dla uporządkowanej błony DMPC/CHL. Oznacza to więc, że inkluzja istotnie bardziej wpływa na zaburzenie lipidów w domenie  $L_D$  niż w domenie  $L_O$ . Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają, że kluczowym czynnikiem decydującym o przeniesieniu inkluzji do domeny  $L_O$  jest minimalizacja niekorzystnych kontaktów pomiędzy wodą a błoną.

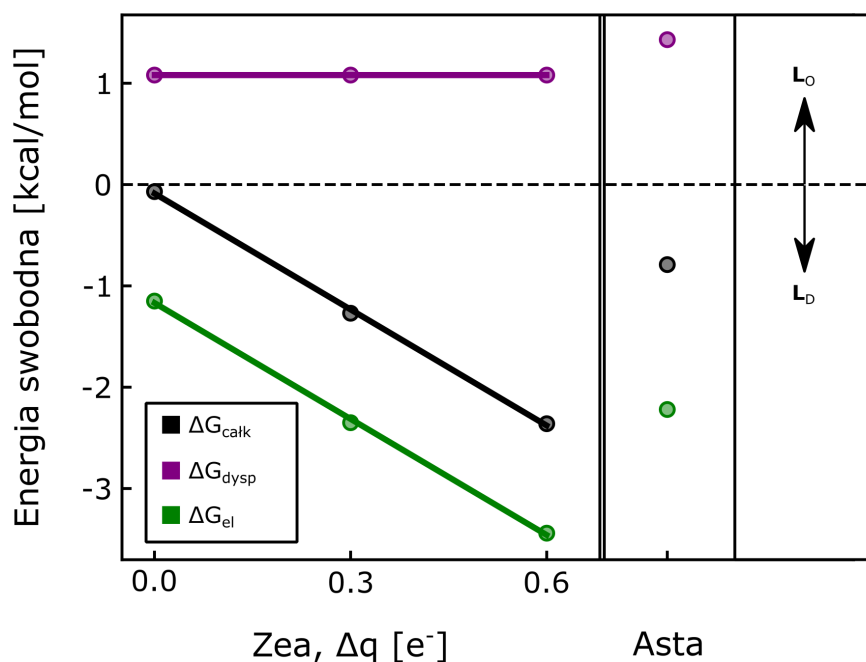
Podsumowując, zaobserwowałem, że gdy w domenie  $L_D$  niedopasowanie hydrofobowe między długością inkluzji a grubością hydrofobowego rdzenia błony jest mniej ujemne niż w domenie  $L_O$ , inkluzja wykazuje wyraźną preferencję dla przebywania w domenie  $L_D$ . Oznacza to, że przeniesienie inkluzji z domeny  $L_O$  do domeny  $L_D$  wiąże się z korzyścią energetyczną, wynikającą zarówno z minimalizacji efektu niedopasowania hydrofobowego jak i z transferu do domeny o mniejszym upakowaniu. Gdy wartości  $\Delta D$  w obu domenach są porównywalne, inkluzja nadal preferuje domenę  $L_D$ , chociaż w mniejszym stopniu niż w pierwszym przypadku. Taki wynik wskazuje na preferencję inkluzji do lokalizowania się w błonie o mniejszym upakowaniu. Przeniesieniu inkluzji do domeny nieuporządkowanej sprzyja elektrostatyczny wkład, który wynika z minimalizacji kontaktów między cząsteczkami wody a lipidami. W związku z tym preferencyjny transfer do domeny  $L_O$  jest możliwy, gdy w domenie  $L_D$  występuje znacznie większe niedopasowanie niż w domenie  $L_O$ . Pokazałem zatem, że inkluzja preferuje domenę uporządkowaną w przypadku, gdy korzyść energetyczna wynikająca z minimalizacji efektu niedopasowania hydrofobowego przewyższa zysk z przeniesienia inkluzji do domeny o mniejszym upakowaniu.

#### 4.4.4 Segregacja rzeczywistych związków o znaczeniu biologicznym

W tej części postanowiłem zweryfikować czy wyniki uzyskane dla segregacji modelowej inkluzji pomiędzy domeny błonowe pozostają w mocy także dla rzeczywistych cząsteczek osadzonych w błonie (w szczególności karotenoidów i peptydów transbłonowych). Podobnie jak w przypadku modelu inkluzji, wykorzystałem w tym celu dwuwarstwę obejmującą dwie domeny błonowe:  $L_O$ , składającą się z lipidów DMPC i cholesterolu (30 % mol) oraz  $L_D$ , składającą się z lipidu DOPC. Do wyznaczenia energii swobodnej przeniesienia cząsteczek między domenami błonowymi wykorzystałem podejście alchemiczne (patrz: podrozdział 3.7.1).

##### Karotenoidy

Przykładem cząsteczek transbłonowych odgrywających istotną rolę w procesach widzenia i fotosyntezy są karotenoidy, w szczególności zeaksantyna i luteina (przedstawione na Rys. 1.5). Są to cząsteczki o sztywnej strukturze, zawierające odpowiednio 11 lub 10 sprzężonych wiązań podwójnych. Ich szkielet składa się z łańcucha węglowego zbudowanego z ośmiu połączonych ze sobą jednostek izoprenowych. Łańcuch polienowy kończy się sześcioczłonowymi pierścieniami  $\beta$ - lub  $\epsilon$ -jononowymi, posiadającymi pojedyncze polarne grupy hydroksylowe (-OH) w pozycji '3'.



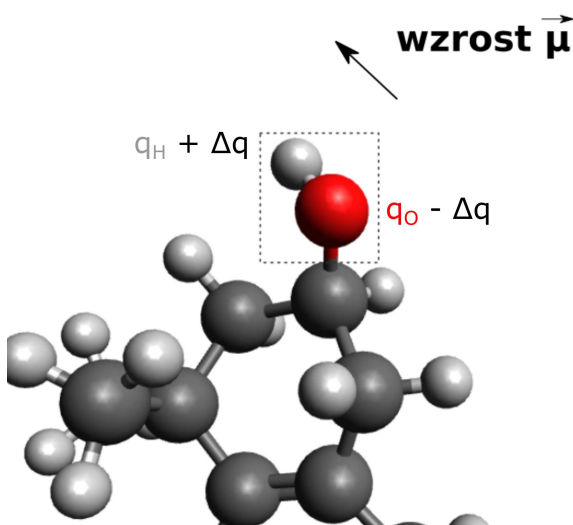
**Rys. 4.23:** Energia swobodna przeniesienia karotenoidów z domeny uporządkowanej do nieuporządkowanej (czarny). Całkowita energia przeniesienia karotenoidu  $\Delta G_{\text{całk}}$  została dodatkowo zdekomponowana na wkłady wynikające z oddziaływań elektrostatycznych,  $\Delta G_{\text{el}}$  (zielony), oraz oddziaływań dyspersyjnych,  $\Delta G_{\text{dysp}}$  (fioletowy). Trendy zmian całkowitej energii swobodnej przeniesienia oraz jej wkładów elektrostatycznego i dyspersyjnego w zależności od zmian ładunku na atomach grupy hydroksylowej karotenoidu są zaznaczone liniami ciągłymi. Strzałki przedstawione po prawej stronie pomagają określić, przeniesieniu do jakiej domeny sprzyjają poszczególne wkłady do  $\Delta G$ .

W celu oceny preferencji karotenoidów do lokalizowania w domenach o różnym stopniu uporządkowania, wyznaczyłem energię swobodną przeniesienia cząsteczki zeaksantyny (Zea) z domeny  $L_O$  do domeny  $L_D$  (Rys. 4.23). Otrzymana wartość  $\Delta G_{\text{całk}} = -0.1$  kcal/mol wskazuje, że Zea nie wykazuje istotnej preferencji względem żadnej z domen błonowych.

Aby sprawdzić wpływ oddziaływań elektrostatycznych i dyspersyjnych na wartość energii swobodnej przeniesienia Zea pomiędzy domenami, przeprowadziłem dekompozycję  $\Delta G_{\text{całk}}$  na składowe  $\Delta G_{\text{dysp}}$  oraz  $\Delta G_{\text{el}}$ . Jak można zobaczyć na Rys. 4.23, wkład pochodzący od oddziaływań dyspersyjnych ma wartość dodatnią ( $\Delta G_{\text{dysp}} = 1.1$  kcal/mol), natomiast wkład pochodzący od oddziaływań elektrostatycznych charakteryzuje się wartością ujemną ( $\Delta G_{\text{el}} = -1.2$  kcal/mol). Można zatem wnioskować, że oddziaływania dyspersyjne przeciwdziałają przeniesieniu Zea z domeny  $L_O$  do domeny  $L_D$ , podczas gdy oddziaływania elektrostatyczne sprzyjają temu przeniesieniu. Wnioski te są w pełni zgodne z wcześniejszymi obserwacjami poczynionymi na podstawie symulacji modelowych inkluzji.

Aby dodatkowo przetestować ten wniosek, postanowiłem dalej sprawdzić, czy zwiększenie polarności cząsteczki Zea może wpłynąć na jej preferencję do transferu do domeny  $L_D$ . W tym celu ponownie wyznaczyłem energię swobodną przeniesienia Zea z domeny  $L_O$  do  $L_D$  dla dwóch innych wartości momentu dipolowego  $\mu$  grup hydroksylowych Zea. Niefizyczną zmianę momentu dipolowego osiągnąłem poprzez zwiększenia ładunków na obu atomach grupy hydroksylowej, w taki sposób, by cząsteczka pozostała elektrycznie obojętna

(Rys. 4.24). W ten sposób przygotowałem układy, w których zwiększyłem polarność Zea poprzez zwiększenie ładunków cząstkowych na atomach grupy hydroksylowej o wartość  $\Delta q$  równą  $0.3e^-$  oraz  $0.6e^-$ .



**Rys. 4.24:** Modyfikacja momentu dipolowego grupy hydroksylowej w cząsteczce zeaksantyny poprzez dodanie ładunku  $\Delta q$  do ładunku atomu wodoru,  $q_H$ , i odjęcie takiego samego ładunku od ładunku atomu tlenu,  $q_O$ . Suma ładunków cząsteczki pozostaje stała, jednak zwiększenie różnicy ładunków między atomem tlenu a atomem wodoru prowadzi do zwiększenia momentu dipolowego grupy hydroksylowej.

Z Rys. 4.23 widać że zwiększenie polarności Zea przy zastosowaniu  $\Delta q = 0.3e^-$  skutkuje wartością  $\Delta G_{\text{całk}} = -1.3$  kcal/mol. Dalsze zwiększanie polarności ( $\Delta q = 0.6e^-$ ) sprawia że wartość ta staje się jeszcze bardziej ujemna ( $\Delta G_{\text{całk}} = -2.4$  kcal/mol). Na tej podstawie można wnioskować, że zwiększenie momentu dipolowego w cząsteczce Zea sprzyja jej przeniesieniu z domeny  $L_O$  do domeny  $L_D$ .

Dekompozycja  $\Delta G_{\text{całk}}$  ukazuje, że zwiększenie polarności Zea skutkuje dodatkowym wzrostem wkładu  $\Delta G_{\text{el}}$  o kolejno 1.2 i 2.2 kcal/mol do wartości  $-2.4$  i  $-3.4$  kcal/mol, odpowiednio dla  $\Delta q = 0.3e^-$  i  $0.6e^-$ . Można zatem wnioskować, że wzrost polarności Zea prowadzi do zwiększenia elektrostatycznej siły napędowej,

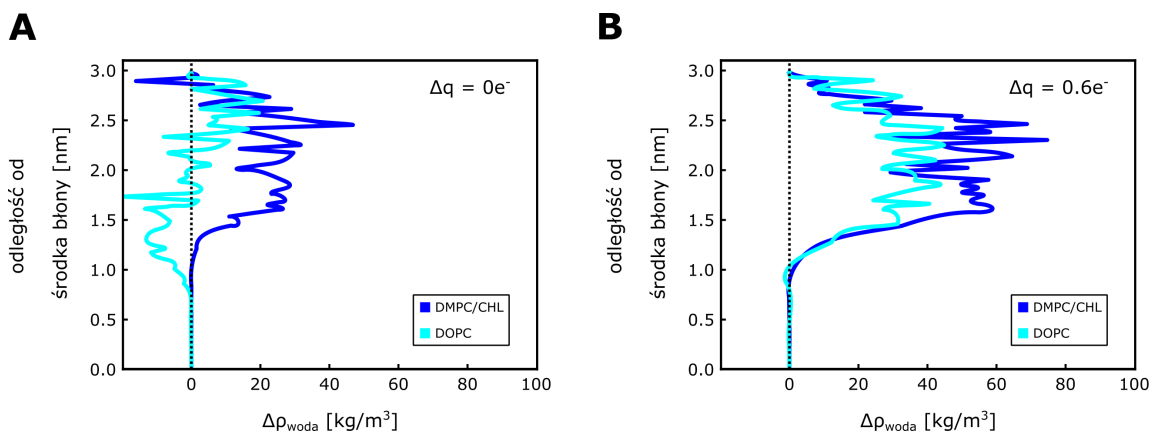
która – jak wcześniej pokazałem – sprzyja przeniesieniu inkluzji do domeny nieuporządkowanej.

Aby móc powyższy wniosek przetestować w sposób pozwalający na eksperymentalną weryfikację, postanowiłem dalej przeprowadzić analogiczne obliczenia z zastosowaniem bardziej polarnej pochodnej Zea, jaką jest astaksantyna (Asta). W porównaniu do Zea, cząsteczka ta posiada dodatkową grupę karbonylową ( $C=O$ ) w pozycji '4' pierścienia  $\beta$ -jononowego (Rys. 4.25).

Zbadałem zmianę energii swobodnej ( $\Delta G_{\text{całk}}$ ) towarzyszącą przeniesieniu cząsteczki Asta z domeny  $L_D$  do  $L_O$ . Jak to pokazuje Rys. 4.23, przeniesieniu cząsteczki Asta odpowiada zmiana  $\Delta G_{\text{całk}} = -0.8$  kcal/mol. Widzimy zatem, że w porównaniu do Zea ( $\Delta G_{\text{całk}} = -0.1$  kcal/mol), bardziej polarne cząsteczki Asta wykazują wyraźną preferencję do lokalizowania się w domenie  $L_D$ .

Dekompozycja  $\Delta G_{\text{całk}}$ , zaprezentowana na Rys. 4.23, wykazała ponadto, że elektrostatyczny i dyspersyjny wkład do energii swobodnej przeniesienia Asta wynoszą, odpowiednio,  $\Delta G_{\text{el}} = -2.2$  kcal/mol i  $\Delta G_{\text{dysp}} = 1.4$  kcal/mol. Porównując te wartości z uzyskanymi wcześniej dla Zea, widzimy że znaczenie wkładu elektrostatycznego wzrasta wyraźnie silniej niż wkładu dyspersyjnego (zmiana odpowiednio o 0.9 i 0.3 kcal/mol w stosunku do Zea). Po raz kolejny zatem możemy zauważyć, że zwiększona polarność cząsteczki, przekładająca się

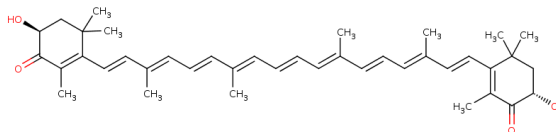
na silniejsze oddziaływania elektrostatyczne, sprzyja jej segregacji do nieuporządkowanej domeny  $L_D$ .



**Rys. 4.26:** Różnicowe profile gęstości wody wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni błony,  $\Delta\rho$ , obliczony jako różnica profili gęstości wody w sąsiedztwie zeaksantyny (Zea) i w błonie niezaburzonej, gdy  $\Delta q = 0e^-$  (A) oraz gdy  $\Delta q = 0.6e^-$  (B).  $\Delta q$  wyraża zmianę ładunków na atomach grupy hydroksylowej względem rzeczywistej cząsteczki Zea (patrz: Rys. 4.24) Osobno pokazane są profile dla Zea osadzonej w domenie uporządkowanej (DMPC/CHL) oraz w domenie nieuporządkowanej (DOPC).

Aby ustalić molekularne przyczyny wzrostu wkładu  $\Delta G_{e1}$  do energii swobodnej segregacji wraz ze wzrostem polarności karotenoidów, przeprowadziłem analizę różnicowych profili gęstości wody, porównując rzeczywistą cząsteczkę Zea ( $\Delta q = 0e^-$ ) z jej wariantem o sztucznie zwiększonej polarności ( $\Delta q = 0.6e^-$ ). Na Rys. 4.26 widzimy, że wzrost polarności Zea prowadzi do zwiększenia nadmiarowej gęstości wody ( $\Delta\rho$ ) w obu domenach. Co istotne, przeniesieniu bardziej polarnej Zea ( $\Delta q = 0.6e^-$ ) z domeny  $L_O$  do  $L_D$  towarzyszy większy spadek liczby niekorzystnych kontaktów woda-błona, co tłumaczy, dlaczego zwiększenie polarności cząsteczki prowadzi do zwiększonej segregacji Zea do domeny  $L_D$ .

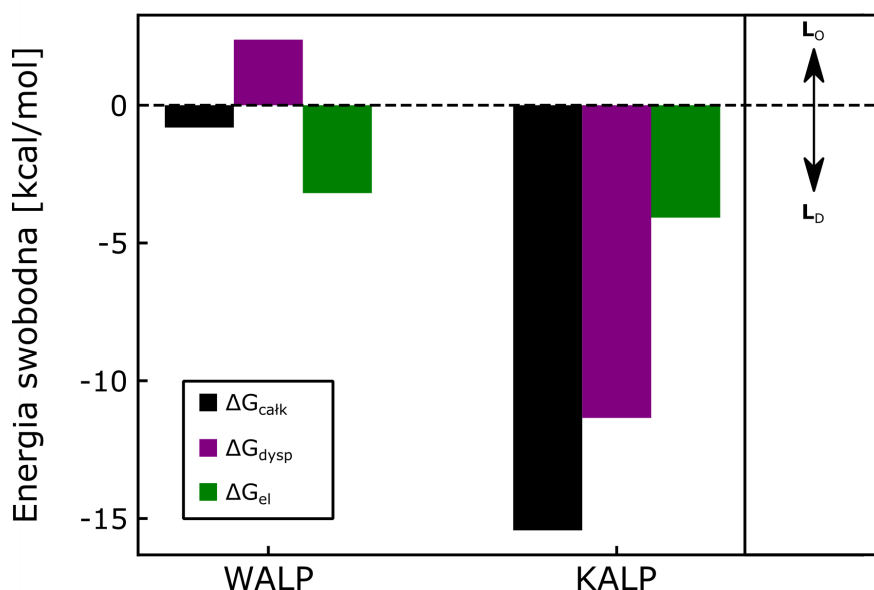
Podsumowując, pokazałem, że wnioski uzyskane dla segregacji modelowych inkluzji znajdują także zastosowanie do prostych cząsteczek transbłonowych, takich jak karotenoidy. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że przeniesieniu Zea do domeny nieuporządkowanej sprzyja wkład elektrostatyczny, wynikający z minimalizacji niekorzystnych kontaktów między wodą a błoną w otoczeniu Zea. Ponadto pokazałem, że zwiększenie polarności cząsteczki (zarówno przez użycie pochodnej zawierającej dodatkowo grupę karbonylową, jak i sztuczne zwiększenie momentu dipolowego grupy hydroksylowej) sprzyja zwiększonej segregacji cząsteczki do domeny nieuporządkowanej. Otrzymane wyniki są obecnie weryfikowane eksperymentalnie w zespole prof. Gruszeckiego (UMCS w Lublinie) przez pomiary współczynników podziału Zea i Asta pomiędzy fazy o różnym stopniu uporządkowania.



**Rys. 4.25:** Struktura chemiczna astaksantyny. W stosunku do Zea astaksantyna zawiera dodatkową grupę karbonylową w pierścieniu  $\beta$ -jononowym.

## Peptydy transbłonowe

Błony lipidowe zawdzięczają swoje zróżnicowane funkcje biologiczne osadzonemu w nim białkom i peptydom. Aby przetestować wnioski dotyczące preferencji inkluzji błonowych do lokowania się w domenach o różnym stopniu uporządkowania przy pomocy rzeczywistych peptydów, skupiłem się następnie na procesach segregacji peptydów WALP i KALP (opisanych w podrozdziale 1.5.1). W związku z powyższym przeprowadziłem obliczenia mające na celu wyznaczenie zmian energii swobodnej  $\Delta G_{\text{całk}}$  towarzyszących przeniesieniu tych peptydów z domeny  $L_O$  do  $L_D$ .

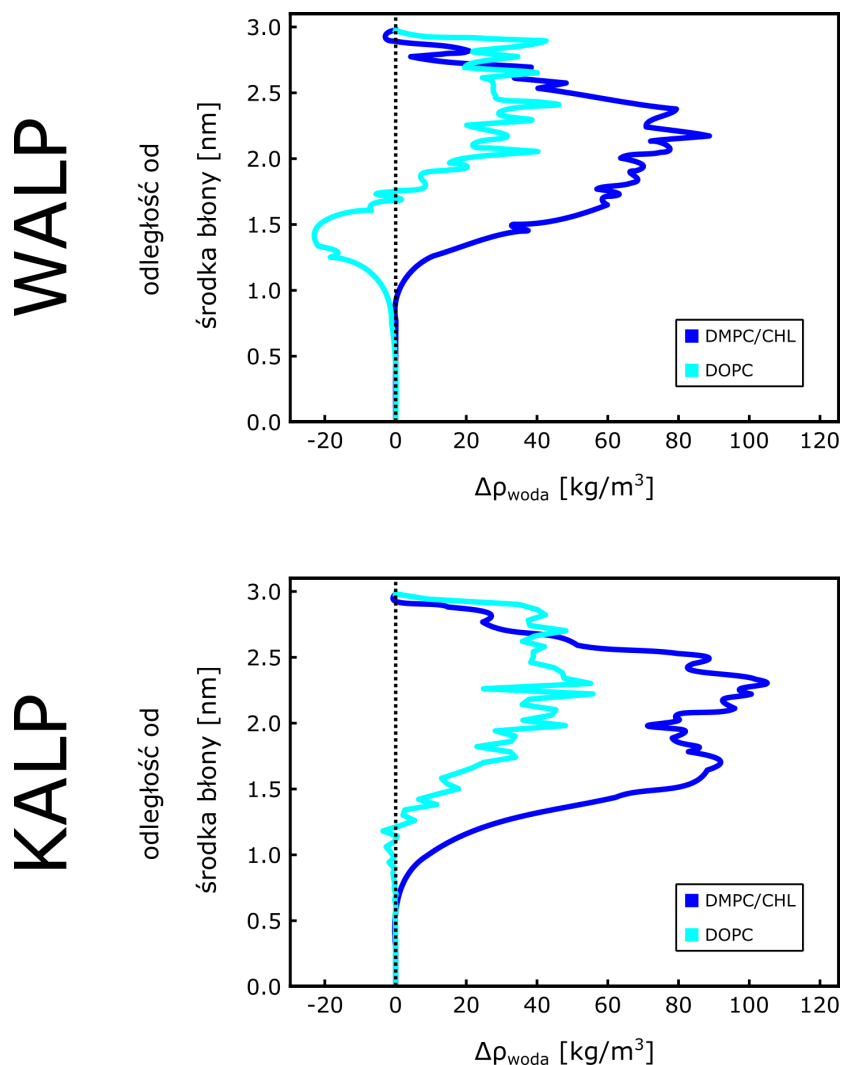


**Rys. 4.27:** Energia swobodna przeniesienia peptydów WALP i KALP z domeny uporządkowanej do nieuporządkowanej (czarny). Całkowita energia przeniesienia peptydu  $\Delta G_{\text{całk}}$  została dodatkowo rozłożona na wkłady wynikające z oddziaływań elektrostatycznych,  $\Delta G_{\text{el}}$  (zielony), oraz oddziaływań dyspersyjnych,  $\Delta G_{\text{dysp}}$  (fioletowy). Strzałki przedstawione po prawej stronie pomagają określić, przeniesieniu do jakiej domeny sprzyjają poszczególne wkłady do  $\Delta G$ .

Jak wynika z Rys.4.27, w przypadku peptydu WALP, który zawiera elektrycznie obojętne reszty tryptofanu jako aminokwasy kotwiczące peptyd do obu powierzchni błony, wartość energii swobodnej przeniesienia  $\Delta G_{\text{całk}}$  wynosi  $-0.8$  kcal/mol. Wskazuje to, że peptydy WALP wykazują pewną preferencję do lokalizowania się w obrębie domeny  $L_D$ . Taki wynik jest zgodny z danymi doświadczalnymi [43, 46].

Dekompozycja  $\Delta G_{\text{całk}}$  na wkłady dyspersyjny i elektrostatyczny ujawniła podobne tendencje, jakie zaobserwowałem dla modelowych inkluzji. Mianowicie, oddziaływania dyspersyjne przeciwdziałają przeniesieniu peptydu do domeny  $L_D$  ( $\Delta G_{\text{dysp}} = 2.4$  kcal/mol), podczas gdy oddziaływania elektrostatyczne sprzyjają lokalizacji w tej domenie ( $\Delta G_{\text{el}} = -3.2$  kcal/mol).

Z Rys. 4.27 wynika z kolei, że w przypadku peptydu KALP, w którym rolę kotwiczenia na powierzchni pełnią dodatnio naładowane reszty lizynowe, preferencja do lokalizowania się w obrębie domeny  $L_D$  jest dużo silniejsza ( $\Delta G_{\text{całk}} = -15.4$  kcal/mol). Dekompozycja  $\Delta G_{\text{całk}}$  sugeruje, że przeniesienie peptydu do  $L_D$  jest napędzane zarówno przez oddziaływania elektrostatyczne ( $\Delta G_{\text{el}} = -4.1$  kcal/mol), jak i dyspersyjne ( $\Delta G_{\text{dysp}} = -11.4$  kcal/mol). Można spekulować, że reszta lizynowa, charakteryzująca się łańcuchem bocznym o dużej swobodzie konformacyjnej, ma utrudnioną możliwość tworzenia korzystnych oddziaływań dyspersyjnych z silnie upakowanymi łańcuchami acylowymi w domenę  $L_O$ . W związku z tym, aby zwiększyć liczbę korzystnych kontaktów peptyd-błona, KALP preferuje domenę o mniejszym uporządkowaniu.



**Rys. 4.28:** Różnicowy profil gęstości wody wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni błony,  $\Delta\rho$ , obliczony jako różnica profili gęstości wody w sąsiedztwie peptydów WALP lub KALP, i w błonie niezaburzonej. Osobno pokazane są profile dla peptydów znajdujących się w domenie uporządkowanej (DMPC/CHL) oraz w domenie nieuporządkowanej (DOPC).

Zadałem sobie następnie pytanie, czy podobnie jak w przypadku modelowych inkluzji, segregacja peptydów z domeny  $L_O$  do domeny  $L_D$  wynika z tendencji do redukowania niekorzystnych kontaktów pomiędzy wodą a lipidami w sąsiedztwie inkluzji. Analiza różnicowych



profilu gęstości wody w otoczeniu peptydów WALP i KALP (Rys. 4.28) ukazuje znacznie większe piki w przypadku domeny uporządkowanej niż nieuporządkowanej. Świadczy to o tym, że przeniesienie peptydów WALP i KALP z domeny  $L_O$  do domeny  $L_D$  wiąże się ze silnym zredukowaniem liczby nadmiarowych cząsteczek wody pozostających w kontakcie z lipidami. Porównując profile dla obu peptydów, można zauważyć, że KALP znacznie bardziej zaburza strukturę błony niż WALP, co jest odzwierciedlone przez większe piki zarówno w przypadku błony DMPC/CHL, jak i DOPC. To potwierdza hipotezę, zgodnie z którą peptyd KALP ma ograniczone możliwości tworzenia korzystnych oddziaływań dyspersyjnych z łańcuchami acylowymi w domenie  $L_O$ .

Można zatem stwierdzić, że analiza procesu przeniesienia prostych peptydów potwierdziła dotychczasowe wnioski uzyskane z badań nad modelową inkluzją, dotyczące segregacji cząsteczek między domenami błonowymi o różnym uporządkowaniu. Uzyskane wyniki, poparte analizą zmian gęstości wody, wnoszą istotny wkład w zrozumienie mechanizmu segregacji peptydów między domenami błonowymi o różnym stopniu uporządkowania.

#### 4.4.5 Podsumowanie

W tym podrozdziale zaprezentowałem wyniki szczegółowych badań dotyczących procesu segregacji inkluzji pomiędzy domenami błonowymi o różnym stopniu uporządkowania konformacyjnego. Wykazałem przede wszystkim istotną rolę niedopasowania hydrofobowego w preferencji inkluzji do lokalizowania się w określonej domenie. Otrzymane przeze mnie wyniki jasno wskazują na współistnienie dwóch przeciwnych sił napędowych kontrolujących proces segregacji: i) oddziaływań elektrostatycznych sprzyjających przeniesieniu inkluzji do domeny  $L_D$ , oraz ii) oddziaływań dyspersyjnych faworyzujących przeniesienie inkluzji do domeny  $L_O$ .

Pokazałem dalej, że elektrostatyczny wkład kierujący inkluzję do domeny  $L_D$  wynika z minimalizacji liczby niekorzystnych kontaktów pomiędzy wodą a błoną w otoczeniu inkluzji. Z uwagi na małą powierzchnię kontaktu między inkluzją a błoną w przypadku ujemnego niedopasowania hydrofobowego, wkład elektrostatyczny dominuje nad wkładem dyspersyjnym, co skutkuje segregacją inkluzji do domeny  $L_D$ .

Z kolei wkład dyspersyjny sprzyja lokalizacji inkluzji w domenie  $L_O$ , ponieważ powierzchnia kontaktu inkluzji z uporządkowanymi łańcuchami lipidowymi jest większa niż w przypadku nieuporządkowanych łańcuchów lipidowych. Pokazałem również, że w sytuacji dodatniego niedopasowania hydrofobowego, powierzchnia kontaktu między inkluzją a lipidami jest duża, stąd wkład dyspersyjny dominuje nad wkładem elektrostatycznym. W efekcie obserwuje się segregację inkluzji do domeny  $L_O$ .

Pokazałem również, że inkluzja wykazuje preferencję dla domeny uporządkowanej w przypadku, gdy korzyść energetyczna związana z minimalizacją efektu niedopasowania hydrofobowego przewyższa zysk wynikający z przeniesienia inkluzji do domeny

o mniejszym upakowaniu. Analiza zmian gęstości wody w otoczeniu inkluzji jednoznacznie wskazuje, że w tym konkretnym przypadku przeniesienie inkluzji z domeny  $L_O$  do  $L_D$  wiąże się z niekorzystnym wzrostem liczby kontaktów między wodą, a błoną.

Wnioski dotyczące segregacji modelowych inkluzji pomiędzy domenami błonowymi, przetestowałem następnie przy wykorzystaniu rzeczywistych cząsteczek transbłonowych: karotenoidów: zeaksantyny i astaksantyny, oraz helikalnych peptydów: WALP i KALP.

Pokazałem, że zeaksantyna wykazuje nieznaczną preferencję do lokalizowania się w domenie nieuporządkowanej. Podobnie jak w przypadku modelowych inkluzji, zauważyłem, że wkład elektrostatyczny sprzyja segregacji zeaksantyny do domeny nieuporządkowanej, podczas gdy wkład dyspersyjny utrudnia ten proces. W zgodzie z tym wnioskiem, wykazałem, że zwiększenie polarności cząsteczki karotenoidu skutkuje zwiększoną preferencją do jej segregacji do domeny nieuporządkowanej. Jest to także zgodne z moimi wcześniejszymi obserwacjami dla modelowych inkluzji, gdzie wkład elektrostatyczny sprzyjał przeniesieniu cząsteczki do domeny o mniejszym upakowaniu.

Przeprowadzone symulacje wykazały także, że peptyd WALP, zakotwiczony do rejonów polarnych błony za pośrednictwem reszt tryptofanu, wykazuje preferencję do domeny nieuporządkowanej, czemu sprzyja wkład elektrostatyczny. Natomiast dla tego samego peptydu, wkład dyspersyjny utrudnia przeniesienie do domeny nieuporządkowanej, podobnie jak w przypadku modelowej inkluzji.

W przypadku peptydu KALP, zawierającego dodatkowo naładowane reszty lizynowe, zauważyłem, że zarówno wkład elektrostatyczny, jak i dyspersyjny, sprzyjają przeniesieniu do domeny nieuporządkowanej. Wynika to z budowy chemicznej lizyny, której łańcuchy nie tworzą korzystnych oddziaływań z acylowymi łańcuchami lipidów. Tłumaczy to korzystny wpływ wkładu dyspersyjnego na segregację inkluzji do domeny nieuporządkowanej, nieobserwowany wcześniej dla modelowej inkluzji.

Generalna spójność wyników otrzymanych dla modelowych inkluzji i rzeczywistych cząsteczek sugeruje uniwersalność mechanizmów biorących udział w segregacji cząsteczek transbłonowych pomiędzy domenami o różnym stopniu uporządkowania.

#### **4.5 Rola niedopasowania hydrofobowego w wybranych procesach o znaczeniu biologicznym**

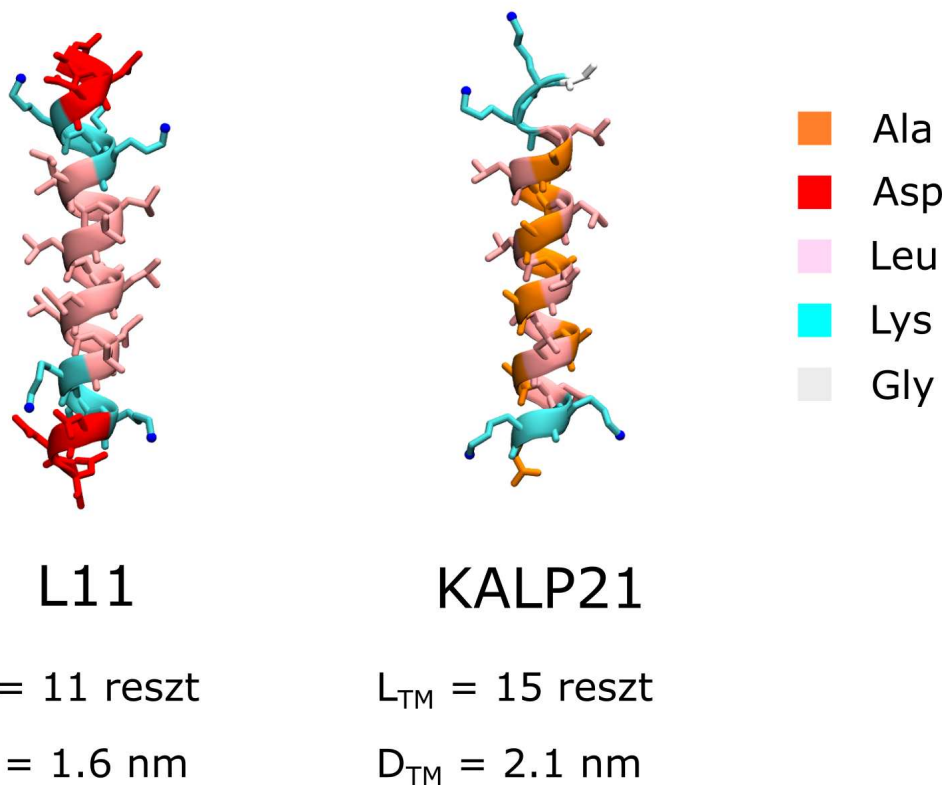
Aby ocenić, w jakim stopniu wnioski wypływające z badań nad modelowymi inkluzjami mają też zastosowanie do układów rzeczywistych, zbadałem dalej rolę, jaką niedopasowanie hydrofobowe może pełnić w wybranych procesach o znaczeniu biologicznym, takich jak specyficzna i niespecyficzna asocjacja oraz reorientacja cząsteczek w błonie. Dodatkowo zbadałem, czy model niedopasowania hydrofobowego może także tłumaczyć zmiany właściwości fizykochemicznych podwójnej warstwy lipidowej wywołane dodatkiem innych cząsteczek amfifilowych.

#### 4.5.1 Asocjacja rzeczywistych inkluzji

W tej sekcji przedstawię wyniki dotyczące wpływu niedopasowania hydrofobowego na asocjację cholesterolu z zaprojektowanymi peptydami transbłonowymi. Ponadto przedstawię, w jaki sposób niedopasowanie hydrofobowe wpływa na wiązanie białka prekursorowego amyloidu (APP) z enzymem błonowym  $\gamma$ -sekreazą. Pokażę także, jak dodatnie niedopasowanie hydrofobowe sprzyja agregacji koniugatów peptydu TP10 z antybiotykiem lewofloksacyną, co prowadzi do powstania obszarów nieciągłości w błonie.

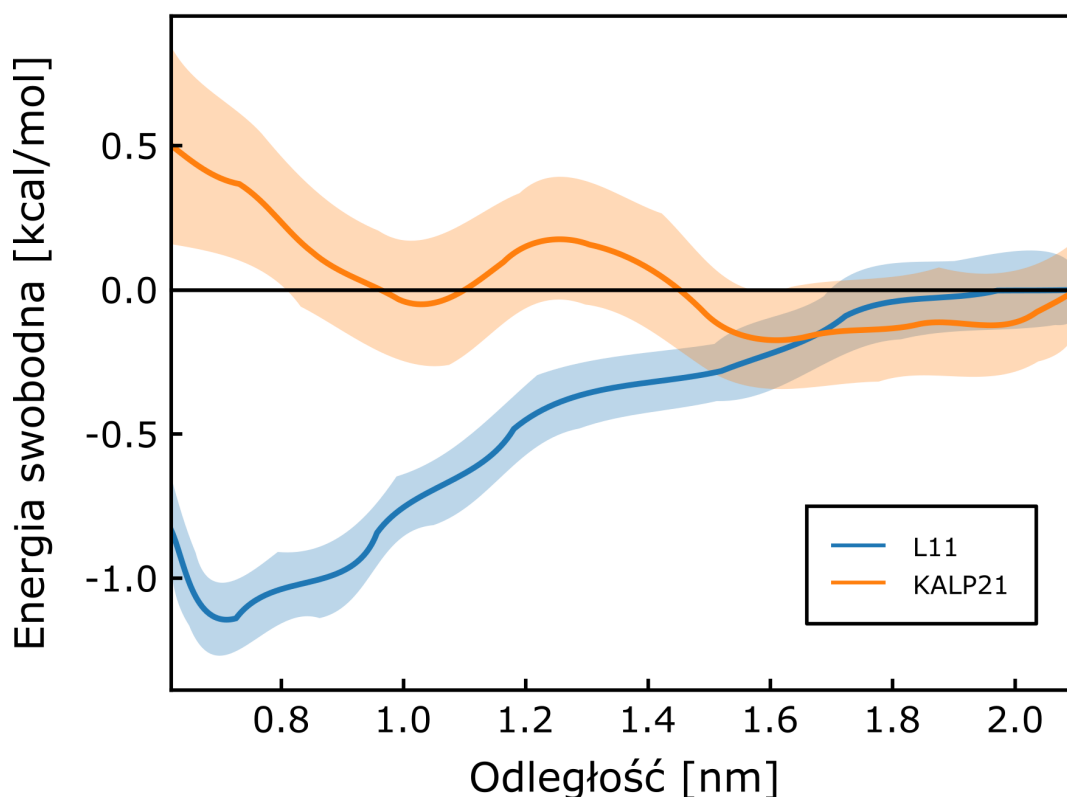
##### Specyficzne wiązanie cholesterolu do peptydów transbłonowych

Tę część badań zrealizowałem we współpracy z zespołem prof. H.J. Risselady (TU Dortmund), który za cel postawił sobie zaprojektowanie sekwencji peptydów transbłonowych wiążących się specyficznie z cholesterollem. Za pomocą podejścia łączącego gruboziarniste symulacje dynamiki molekularnej z optymalizacyjnym algorytmem genetycznym, zespół powyższy zaproponował, że peptyd o sekwencji  $D_3K_3L_{11}K_3D_3$  (oznaczany jako L11; Rys. 4.29) jest zdolny do specyficznego wiązania cholesterolu w obrębie dwuwarstwy lipidowej.



**Rys. 4.29:** Struktura peptydów L11 oraz KALP21. Poszczególne rodzaje aminokwasów zostały oznaczone kolorystycznie zgodnie z legendą. Dodatkowo na niebiesko oznaczyłem atomy azotu w łańcuchu bocznym reszt lizyny. Poniżej każdego peptydu podałem liczbę reszt tworzących jego fragment hydrofobowy ( $L_{TM}$ ) oraz odpowiadającą mu długość hydrofobową ( $D_{TM}$ ).

Moim zadaniem było zweryfikowanie tej hipotezy, z zastosowaniem pełnoatomowego wariantu dynamiki molekularnej. W tym celu wyznaczyłem profil energii swobodnej opisujący asocjację peptydu L11 z cholesterolem w błonie składającej się z fosfolipidów POPC i cholesterolu o stężeniu 30 % mol (POPC/CHL). Dla celów porównawczych przeprowadziłem analogiczne obliczenia dla peptydu KALP21, który jest znany z braku specyficznego wiązania cholesterolu. Struktury obu peptydów wraz z ich długościami hydrofobowymi przedstawiłem na Rys. 4.29.



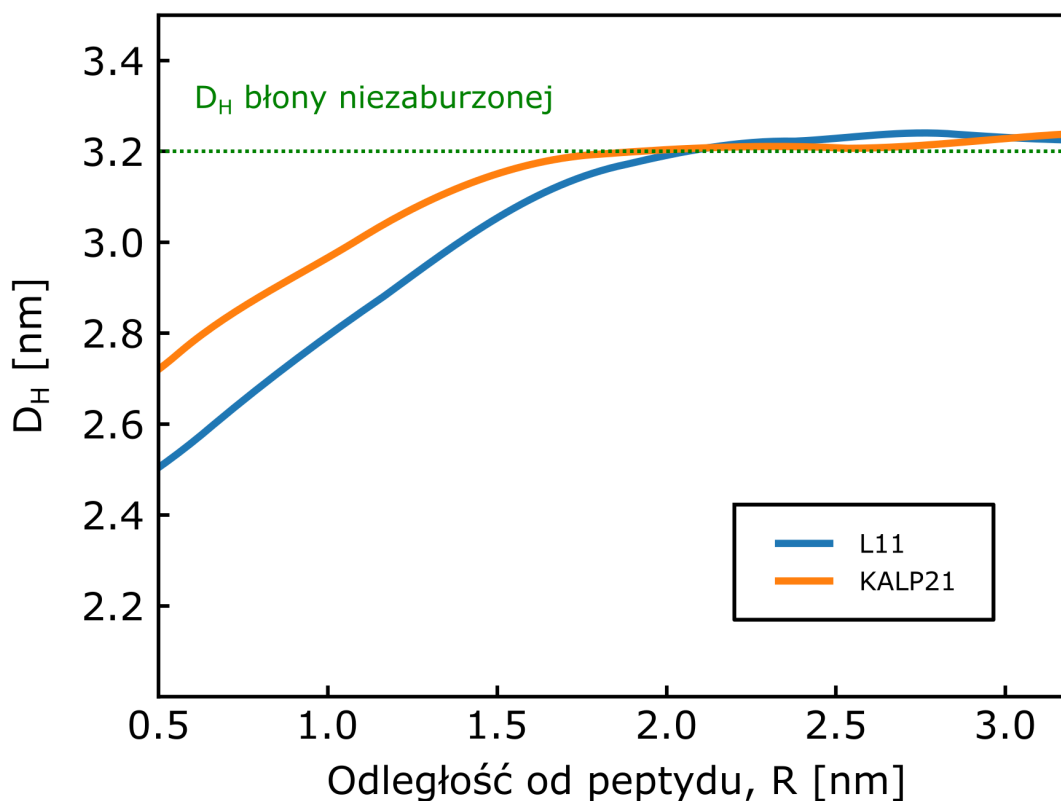
**Rys. 4.30:** Profile energii swobodnej dla wiązania cholesterolu z peptydami L11 i KALP21. Współrzędna reakcji została zdefiniowana jako odległość między środkami mas układu steroidowego cholesterolu i atomów  $C_{\alpha}$  reszt aminokwasowych 1-11 (w L11) oraz 1-12 (w KALP21), stanowiących połowę sekwencji każdego z peptydów. Dodatkowo, ta odległość została zrzutowana na płaszczyznę równoległą do powierzchni błony.

Wyniki pokazane na Rys. 4.30 ujawniają wyraźne minimum energetyczne w przypadku cholesterolu związanego z L11 (odległość około 0.7 nm), osiągające głębokość ok.  $-1.2$  kcal/mol. Natomiast w przypadku peptydu KALP21, dla tej samej odległości, nie zaobserwowałem minimum energetycznego. Zatem symulacje pełnoatomowe potwierdzają dotychczasowe wnioski sugerujące, że – w przeciwieństwie do peptydu KALP21 – L11 wykazuje pewną specyficzną względną do cholesterolu.

Aby wyjaśnić różnice w zdolności obu peptydów do wiązania cholesterolu, obliczyłem ich długości hydrofobowe ( $D_{TM}$ ). Dla L11 długość ta wyniosła 1.6 nm, podczas gdy dla KALP21 wynosiła ona 2.1 nm. Ustaliłem również, że średnia grubość warstwy hydrofobowej

w niezaburzonej błonie POPC/CHL ( $D_H$ ) wyniosła około 3.2 nm. Wobec tego, umieszczenie zarówno L11, jak i KALP21 w obrębie tej błony skutkuje pojawieniem się ujemnego niedopasowania hydrofobowego. Jest ono jednak wyraźnie większe dla L11 ( $\Delta D = -1.6$ ) niż dla KALP21 ( $\Delta D = -1.1$  nm).

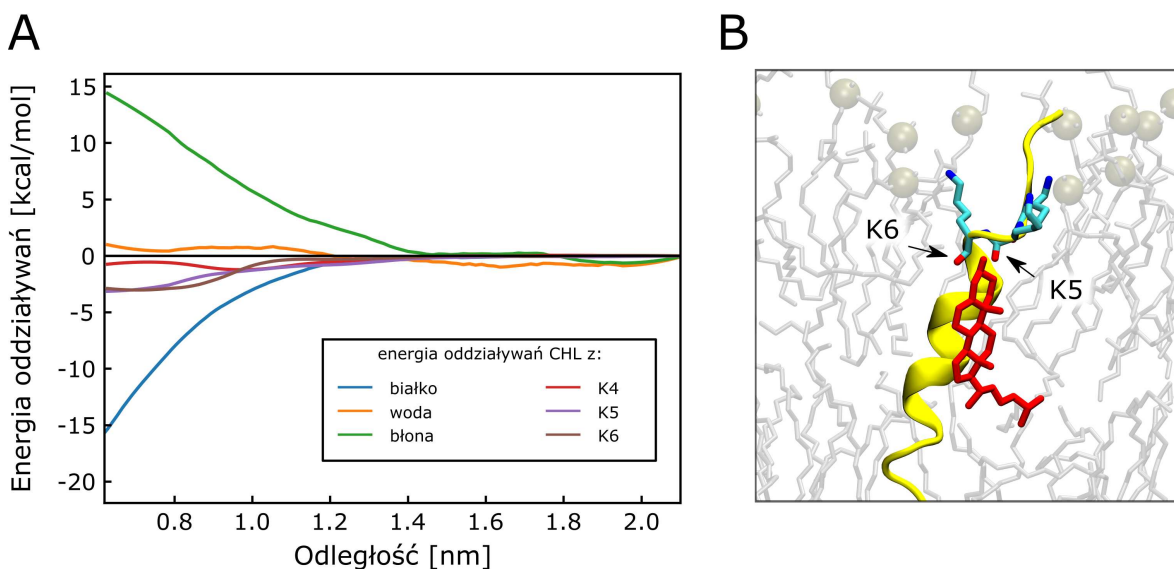
W badaniach nad modelowymi inkluzjami pokazałem, że wielkość  $\Delta D$  istotnie wpływa na stopień zaburzenia błony, co skutkuje tym większym ścienieniem błony i obszarem zaburzenia błony, im silniej ujemne jest  $\Delta D$ . W związku z tym chciałem sprawdzić, czy bardziej ujemne  $\Delta D$  dla L11 w porównaniu do KALP21 idzie w parze ze zwiększonym zaburzeniem błony. W tym celu wyznaczyłem  $D_H$  w funkcji odległości od peptydu L11 oraz KALP21 (R).



**Rys. 4.31:** Lokalna grubość hydrofobowego rdzenia błony ( $D_H$ ) w zależności od odległości od peptydu L11 lub KALP21 (R). Dodatkowo, przerywaną linią oznaczyłem przybliżoną wartość  $D_H$  dla błony niezaburzonej.

Na Rys. 4.31 pokazałem, że w przypadku peptydu L11, wartość  $D_H$  w odległości 0.5 nm od peptydu wynosi około 2.5 nm, a krzywa osiąga wartość odpowiadającą  $D_H$  błony niezaburzonej dla R o wartości około 2.0 nm. Analogicznie, dla peptydu KALP21 uzyskałem wartości  $D_H$  około 2.7 nm oraz R o wartości około 1.5 nm. Wobec tego można zauważyć, że peptyd L11 znacznie bardziej zaburza błonę niż KALP, a grubość błony w sąsiedztwie L11 jest znacznie mniejsza niż w przypadku KALP. Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają postawioną przeze mnie hipotezę.

Dotychczasowe badania [186] wykazały, że ze względu na swoją strukturę chemiczną, cząsteczki cholesterolu mogą znacznie łatwiej reorientować się w błonie niż cząsteczki lipidów. W wyniku tego obserwuje się często akumulację cholesterolu w zaburzonych obszarach błony. Ponieważ L11 bardziej ściśnia błonę w swoim sąsiedztwie niż KALP21, można przypuszczać, że siła napędowa do asocjacji cholesterolu z tym pierwszym peptydem będzie większa.



**Rys. 4.32:** (A) Zależność energii oddziaływania pomiędzy cząsteczką cholesterolu a: peptydem L11 (niebieski), wodą (pomarańczowy) i błoną (zielony). Dodatkowo zostały przedstawione profile energii oddziaływania cholesterolu z trzema resztami lizyny: K4, K5 i K6. (B) Struktura przedstawiająca tworzenie się korzystnych oddziaływań cholesterolu (czerwony) z resztami lizyny K5 i K6 (błękitny) znajdującymi się w peptydzie L11 (żółty).

Aby szczegółowo zbadać mechanizm stabilizacji kompleksu cholesterolu z peptydem L11, dokonałem analizy zmian energii oddziaływań pomiędzy cząsteczką cholesterolu a poszczególnymi elementami układu w procesie wiązania cholesterolu do peptydu (Rys. 4.32A). Ze względu na obecność nietypowego klastra lizynowego w sekwencji L11, osobno wyznaczyłem energie oddziaływania cholesterolu z trzema resztami lizynowymi (K4, K5 i K6).

Jak można zaobserwować na Rys. 4.32A, wiązaniu cząsteczek towarzyszy spadek energii potencjalnej oddziaływania cholesterolu z peptydem, z czego za niemal połowę odpowiada wytworzenie korzystnych oddziaływań z resztami K5 i K6. Zgodnie z oczekiwaniami, ten korzystny spadek energii potencjalnej związany z oddziaływaniami cholesterol-peptyd jest skompensowany przez niekorzystny wzrost energii cholesterol-błona wynikający z częściowej utraty kontaktów między cholesterol-em a cząsteczkami lipidów. W wyniku tworzenia kompleksu nieznacznie osłabieniu podlegają też oddziaływania pomiędzy cholesterol-em a wodą.

Wyznaczony przeze mnie profil  $D_H$  (Rys. 4.31) oraz analiza zmian energii oddziaływań (Rys. 4.32A) sugerują, że minimum na krzywej energii swobodnej, opisującej wiązanie cholesterolu do L11 (patrz: Rys. 4.30) wynika z dwóch głównych czynników. Po pierwsze,



z wystąpienia ścienienia błony w otoczeniu L11, a po drugie, ze specyficznego oddziaływania cholesterolu z resztami lizynami. Reprezentatywną klatkę przedstawiającą, jak cholesterol wiąże się z L11, zaprezentowałem na Rys. 4.32B.

Podsumowując, zmiany energii swobodnej towarzyszące asocjacji cholesterolu z peptydami L11 i KALP21 ujawniają, że możliwe jest zaprojektowanie peptydów wykazujących pewną specyficzność względem cholesterolu. Wiązanie może mieć miejsce zwłaszcza wtedy, gdy mamy do czynienia z silnie ujemnym niedopasowaniem hydrofobowym pomiędzy peptydem a grubością błony prowadzącym do znaczącego ścienienia błony w sąsiedztwie peptydu. Długość hydrofobowa cholesterolu jest wyraźnie krótsza niż u lipidów, a co więcej, cholesterol może stosunkowo łatwo dostosowywać tę długość poprzez zmianę konformacji łańcucha bocznego. Dlatego też cholesterol chętnie gromadzi się w obszarze ścienienia błony. Dodatkowo, stabilność wiązania cholesterolu do peptydu może zostać zwiększona przez polarne oddziaływania pomiędzy resztami lizynowymi a grupą hydroksylową cholesterolu.

#### **Wiązanie białka prekursorowego amyloidu do $\gamma$ -sekreazy**

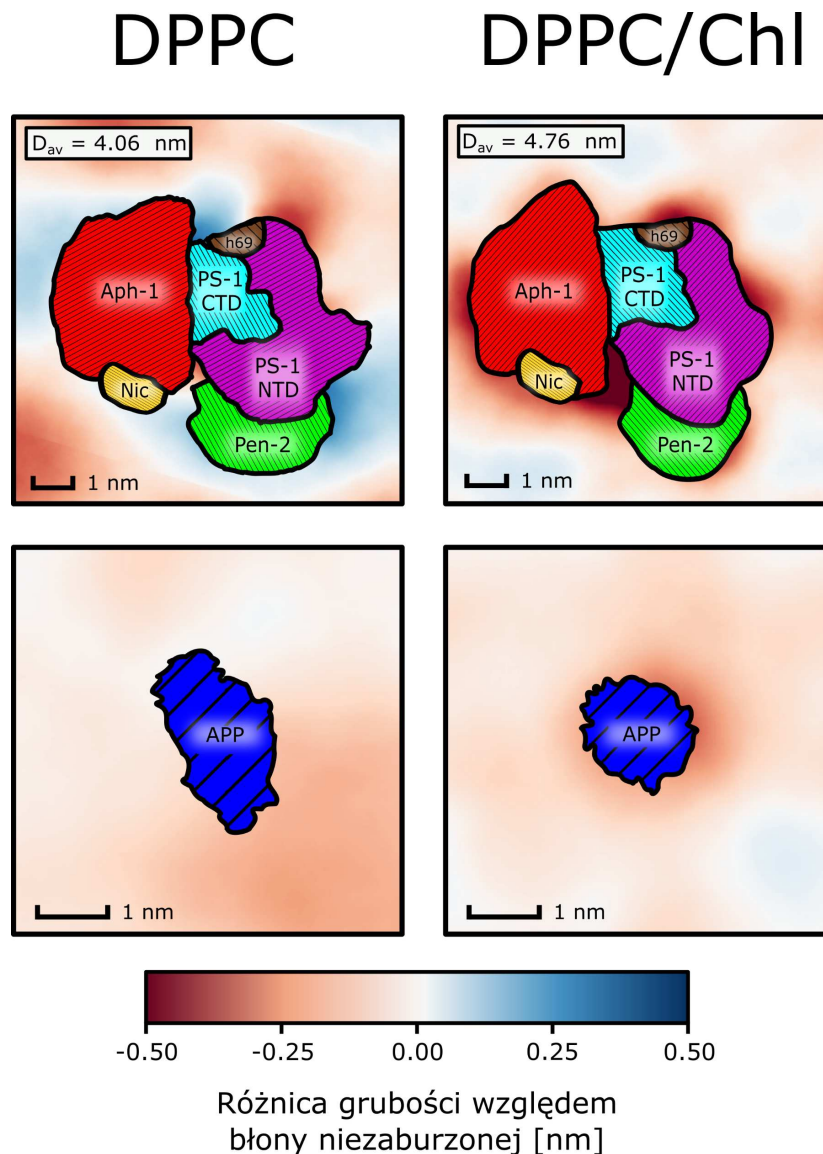
$\gamma$ -sekreaza to białko, której główną funkcją jest rozszczepianie peptydów i białek sygnalizacyjnych w obrębie ich domeny transbłonowej [67]. Składa się z czterech głównych podjednostek: preseniliny (PS-1), PEN-2, APH-1 oraz nikastryny, których strukturę i umiejscowienie w błonie przedstawiłem na Rys. 1.2. Jednym z najbardziej znanych substratów  $\gamma$ -sekreazy jest białko prekursorowe amyloidu (APP), które jest związane z rozwojem choroby Alzheimera.

W kontekście przedstawionego w podrozdziale 1.6.2 wpływu cholesterolu na aktywność proteolityczną  $\gamma$ -sekreazy, wraz z dr. Łukaszem Nierzwickim podjęliśmy próbę ustalenia molekularnego podłoża tej zależności. W szczególności, zaintrygowała nas różnica pomiędzy długością substratów takich jak APP a grubością błonowej fazy uporządkowanej indukowanej obecnością cholesterolu, która prowadzi do znacznego ujemnego niedopasowania hydrofobowego.

Wyniki uzyskane przez dr. Nierzwickiego ukazały, że gdy błona DPPC jest wzbogacona w cholesterol (DPPC/Chl), APP chętnie wiąże się z  $\gamma$ -sekreazą w centrum katalitycznym, znajdującym się w rejonie helis 6 i 9 podjednostki PS-1 (h69). Natomiast usunięcie cholesterolu skutkowało istotnym zmniejszeniem powinowactwa APP do h69. W związku z tym zadałem sobie pytanie, czy dodanie cholesterolu do błony DPPC rzeczywiście skutkuje pojawieniem się niedopasowania hydrofobowego pomiędzy substratem a grubością błony i czy to niedopasowanie może odpowiadać za zwiększone powinowactwo substratu do  $\gamma$ -sekreazy. W tym celu przeprowadziłem analizę map lokalnej grubości błon DPPC oraz DPPC/Chl, zarówno w otoczeniu  $\gamma$ -sekreazy jak i APP.

Na Rys. 4.33 możemy zaobserwować, że w błonie zawierającej cholesterol istnieje wyraźny obszar o zmniejszonej grubości w sąsiedztwie h69, co wskazuje na występowanie w tym miejscu ujemnego niedopasowania hydrofobowego. Natomiast w błonie złożonej

tylko z DPPC można zauważyć obszary o nieznacznie zwiększonej, jak i zmniejszonej lokalnej grubości. Stwierdzamy zatem brak istotnych różnic w porównaniu do uśrednionej wartości grubości błony w sąsiedztwie h69.



**Rys. 4.33:** Różnicowe mapy lokalnej grubości błony w otoczeniu  $\gamma$ -sekreazy oraz APP w błonach DPPC i DPPC/Chl różniących się średnimi grubościami ( $D_{av}$ ).

Podobnie, mapy grubości przedstawiające obie błony w otoczeniu APP (Rys. 4.33) również ujawniły różnice. W błonie zawierającej cholesterol widzimy wyraźny obszar ścięnienia błony, co wskazuje na ujemne niedopasowanie hydrofobowe. W przypadku błony pozbawionej cholesterolu nie obserwujemy zmian w lokalnej grubości błony. Ponadto, różnice w kształtach APP pomiędzy błonami sugerują, że cząsteczka APP jest przechylona w cieńszej błonie DPPC, aby zminimalizować dodatnie niedopasowanie hydrofobowe. Jak to ustaliłem w części dotyczącej modelowych inkluzji, przechylenie się cząsteczek trans-

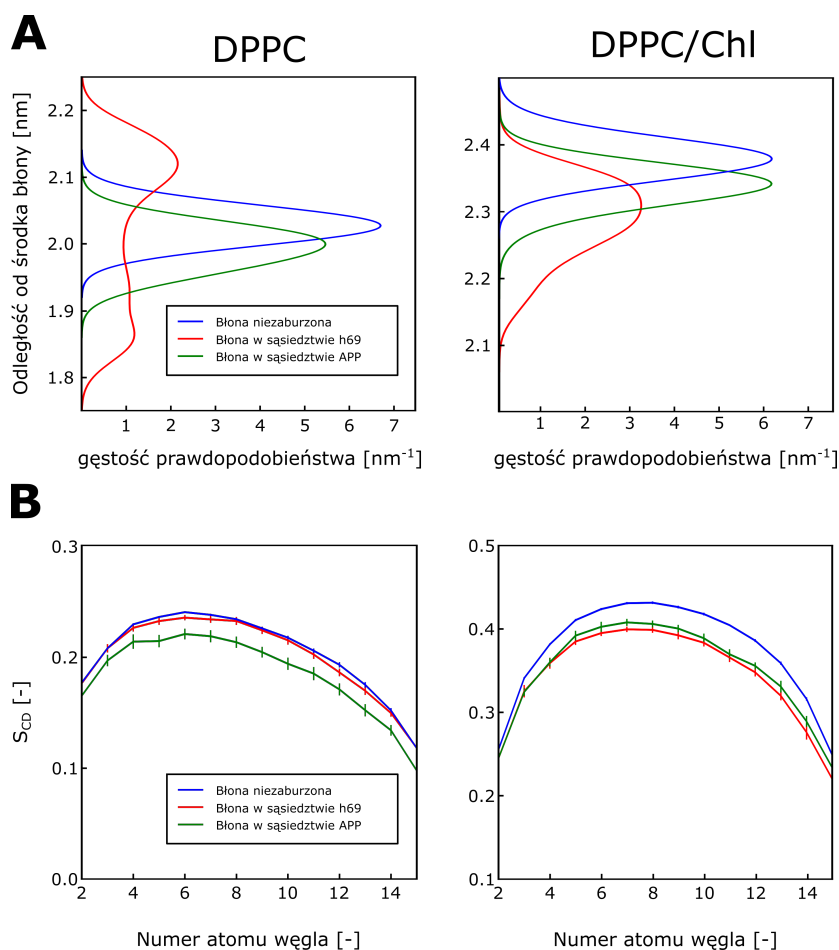
blonowych w wyniku dodatniego niedopasowania hydrofobowego zmniejsza siłę napędową do ich asocjacji.

Zdecydowałem się skoncentrować na analizie grubości błony w obszarze h69  $\gamma$ -sekretazy i APP, aby dokładniej zrozumieć, w jaki sposób zmiany w średnich grubościach błony w tych obszarach przyczyniają się do kształtowania sił napędowych sprzyjających asocjacji substratów. Wyzaczyłem profile gęstości fosforanów wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni błony w otoczeniu h69, APP oraz w niezaburzonej błonie. Na Rys. 4.34A można zaobserwować, że w przypadku błony DPPC/Chl położenia maksimum profilu opisujących gęstość fosforanów w sąsiedztwie h69 oraz APP są przesunięte w kierunku mniejszych odległości od środka błony w porównaniu do błony niezaburzonej. Oznacza to, że średnie grubości błony w sąsiedztwie substratów, obliczone na podstawie tych profili, są mniejsze niż dla błony niezaburzonej. W konsekwencji, profile potwierdzają obserwacje z Rys. 4.33, zgodnie z którymi zarówno w sąsiedztwie h69, jak i APP pojawia się ujemne niedopasowanie hydrofobowe, które jest odpowiedzialne za pojawienie się sił napędowych sprzyjających asocjacji.

W przypadku błony DPPC (Rys. 4.34A) możemy zauważyć, że położenie maksimum profilu jest przesunięte względem niezaburzonej błony w kierunku mniejszych odległości wyłącznie w sąsiedztwie APP. Dlatego możemy stwierdzić, że średnia grubość błony w sąsiedztwie APP jest mniejsza niż dla błony niezaburzonej. Natomiast dla błony w sąsiedztwie h69 obserwujemy profil z dwoma maksimumami, gdzie wyższe maksimum występuje dla odległości większej niż dla błony niezaburzonej, z kolei niższe znajduje się w odległości mniejszej niż dla błony niezaburzonej. Na podstawie tych danych możemy stwierdzić, że średnia grubość błony w sąsiedztwie h69 jest podobna jak w przypadku błony niezaburzonej. Analizując średnie grubości błon dochodzimy do wniosku, że w sąsiedztwie APP występuje ujemne niedopasowanie hydrofobowe, podczas gdy w sąsiedztwie h69 nie pojawia się takie niedopasowanie. Może to wyjaśniać, dlaczego asocjacja APP i h69 w błonie DPPC nie jest tak faworyzowana jak w przypadku DPPC/Chl.

Zmiany w średnich grubościach błony są zwykle powiązane ze zmianami w uporządkowaniu konformacyjnym łańcuchów acylowych lipidów [5]. W związku z tym, postanowiłem sprawdzić, w jaki sposób współczynniki uporządkowania ( $S_{CD}$ ) lipidów zmieniają się w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla błony niezaburzonej.

Współczynnik  $S_{CD}$  dostarcza informacji na temat orientacji strukturalnej oraz elastyczności łańcuchów lipidowych, co można powiązać z ich entropią konformacyjną. Wysokie wartości  $S_{CD}$  (w zakresie od 0.2 do 0.5) sugerują, że łańcuchy lipidowe ułożone są w orientacji prostopadłej do powierzchni błony oraz charakteryzują się niewielką swobodą konformacyjną, co przekłada się na niską entropię konformacyjną. Te cechy są typowe dla błon zawierających nasycone lipidy, zwłaszcza w obecności domieszki cholesterolu, co sprzyja zwiększeniu uporządkowania lipidów.



**Rys. 4.34:** (A) Profile gęstości fosforanów wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni błony w otoczeniu h69, APP oraz w niezaburzonej błonie. Średnią grubość błony obliczyłem poprzez uśrednienie z odpowiednimi wagami odległości pomiędzy fosforanami z obu listków dwuwarstwy. W przypadku błony DPPC można zauważyć, że grubość błony w sąsiedztwie APP jest mniejsza niż dla błony niezaburzonej. Natomiast w sąsiedztwie h69 widzimy dwumodalny rozkład, dla którego uśredniona wartość grubości sugeruje brak istotnych różnic w porównaniu ze średnią grubością błony niezaburzonej. W błonie DPPC/Chl można zauważyć zmniejszoną grubość w otoczeniu zarówno h69, jak i APP, w porównaniu do niezaburzonej błony. (B) Zależność współczynnika uporządkowania  $S_{CD}$  (opisana w podrozdziale 3.7.3) od numeru atomu węgla '2' do '15' w łańcuchach acylowych lipidów w otoczeniu h69, APP oraz w niezaburzonej błonie. W przypadku błony DPPC można zauważyć wyraźny spadek  $S_{CD}$  dla lipidów znajdujących się w sąsiedztwie APP w porównaniu do niezaburzonej błony, podczas gdy w otoczeniu h69 nie obserwujemy istotnych zmian. Z kolei w błonie DPPC/Chl obserwujemy spadek  $S_{CD}$  zarówno w otoczeniu APP, jak i h69, w porównaniu do błony niezaburzonej.

Z kolei niskie wartości  $S_{CD}$  (w zakresie od 0.0 do 0.2) wskazują na duże odchylenie łańcuchów lipidowych od orientacji prostopadłej, a także na wysoką swobodę konformacyjną lipidów i związane z tym zwiększenie entropii konformacyjnej. Takie wartości  $S_{CD}$  są charakterystyczne dla błon zawierających nienasycone lipidy.

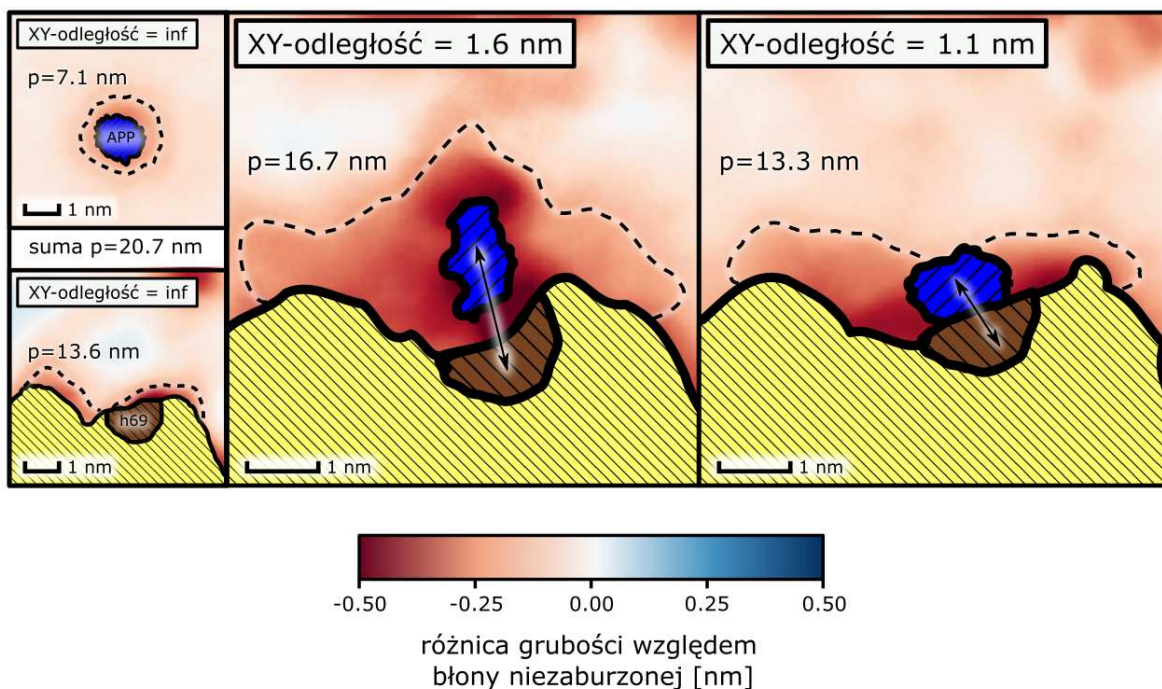
Rys. 4.34B ilustruje, że w błonie DMPC/Chl w otoczeniu zarówno h69, jak i APP, obserwuje się obniżenie wartości współczynnika  $S_{CD}$  w porównaniu do niezaburzonej błony. Stwierdzamy zatem, że pojawienie się ujemnego niedopasowania hydrofobowego w obszarze h69 i APP przekłada się na zmniejszenie uporządkowania konformacyjnego łańcuchów acylowych lipidów.

Z kolei w przypadku błony DPPC (Rys. 4.34B) widzimy spadek wartości  $S_{CD}$  względem błony niezaburzonej wyłącznie w obszarze błony w sąsiedztwie APP, co jest zgodne z wcześniej zaobserwowanym ujemnym niedopasowaniem hydrofobowym (Rys. 4.34A).



W błonie tej natomiast nie obserwujemy wyraźnych różnic w wartościach  $S_{CD}$  pomiędzy rejonem sąsiadującym z h69 a błoną niezaburzoną. Ponownie dobrze koresponduje to z brakiem niedopasowania hydrofobowego w tym obszarze.

Wyznaczone przeze mnie grubości błon oraz profile  $S_{CD}$  sugerują istotną rolę niedopasowania hydrofobowego w procesie wiązania substratów przez  $\gamma$ -sekreazę. Zadałem sobie zatem pytanie, czy wpływ niedopasowania hydrofobowego na powinowactwo substratów do  $\gamma$ -sekreazy jest dominujący. Czy może, alternatywnie, występują inne, równie ważne efekty, które także wymagają uwzględnienia (np. specyficzne oddziaływania z cholesterolem). W związku z tym, postanowiłem oszacować wkład do energii swobodnej wiązania, związany z niedopasowaniem hydrofobowym ( $\Delta G_{\Delta D}$ ), korzystając z teorii napięcia liniowego (patrz: podrozdział 1.5.3). Teoria ta pozwala na oszacowanie wkładu do energii swobodnej asocjacji wynikającego ze zmniejszenia się obwodu obszaru zaburzonego przez asocjujące cząsteczki. W tym celu obliczyłem obwody obszarów lokalnego ścienienia błony, które zdefiniowałem jako obszary, gdzie grubość błony była o 1.5 nm mniejsza w porównaniu z grubością błony niezaburzonej. Obwody te policzyłem dla trzech przypadków: i) gdy cząsteczki znajdują się z dala od siebie (XY-odległość  $\rightarrow \infty$ ), ii) w stanie pośrednim (XY-odległość około 1.6 nm) oraz iii) w stanie związanym (XY-odległość około 1.1 nm).



**Rys. 4.35:** Mapy lokalnej grubości błony w otoczeniu APP oraz h69 w odległości: (lewy) nieskończenie dużej, (środkowy) 1.6 nm oraz (prawy) 1.1 nm. Na mapach pokazałem także oszacowane wartości obwodów obszaru lokalnego ścienienia błony ( $p$ ), zaznaczone liniami przerywanymi.

Wyniki przedstawione na Rys. 4.35 wskazują, że asocjacja cząsteczek wiąże się ze zmniejszeniem obwodu obszaru zaburzenia błony o  $\Delta p = -7.4$  nm. Zgodnie z definicją zawartą w podrozdziale 1.5.3, do oszacowania  $\Delta G_{\Delta D}$  niezbędne jest (choćby zgrubne) oszacowanie wartości napięcia liniowego  $\sigma$ . Ponieważ błona DMPC/Chl w sąsiedztwie h69 i APP,





a także w stanie niezaburzonym, różnią się stopniem uporządkowania konformacyjnego lipidów (Rys. 4.34), postanowiłem wykorzystać tu zmierzone doświadczalnie wartości napięcia liniowego  $\sigma$  między domeną uporządkowaną a nieuporządkowaną, wynoszące około 1–3 pN [187]. Dzięki temu oszacowałem, że  $\Delta G_{\Delta D}$  mieści się w przedziale od  $-1.1$  do  $-3.2$  kcal/mol. Taka wartość jest zgodna z energią swobodną asocjacji APP przez h69 ( $\Delta G_{\text{asocjacja}}$ ) otrzymaną przez dr. Łukasza Nierzwickiego, wynoszącą około  $-3.6$  kcal/mol.

Dodatkowo, analiza różnic między stanem pośrednim a stanem zdysocjowanym prowadzi do wyników odpowiednio:  $\Delta p = 4$  nm oraz  $\Delta G_{\Delta D} \in (-1.7, -0.6)$  kcal/mol. W związku z tym możemy twierdzić, że niedopasowanie hydrofobowe jest odpowiedzialne za dalekozasięgowe przyciąganie między APP a  $\gamma$ -sekretazą, co sugeruje również nachylenie profilu na Rys. 1.3). Moje wyniki pokazują więc, że niedopasowanie hydrofobowe ma kluczowy wpływ na wiązanie substratów przez  $\gamma$ -sekretażę, ponieważ oszacowana przeze mnie wartość  $\Delta G_{\Delta D}$  z zastosowaniem teorii napięcia liniowego pokrywa się z wartością  $\Delta G_{\text{asocjacja}}$  uzyskaną poprzednio na podstawie profilu energii swobodnej (patrz: Rys. 1.3). Co więcej, uzyskane wyniki sugerują, że wiązanie APP przez  $\gamma$ -sekretażę jest wynikiem dalekozasięgowych sił mediowanych przez zaburzone cząsteczki lipidów.

Podsumowując, w tym podrozdziale zaproponowałem wyjaśnienie roli cholesterolu w procesie wiązania APP przez  $\gamma$ -sekretażę, wskazując na istotny wpływ niedopasowania hydrofobowego dla tego wiązania. Pokazałem, że dodanie cholesterolu do błony DPPC prowadzi do istotnego jej pogrubienia. W tak zmodyfikowanej błonie, w sąsiedztwie zarówno APP jaki i centrum katalitycznego  $\gamma$ -sekretaży, które znajduje się w pobliżu helis '6' i '9' preseniliny (h69), obserwujemy obszary lokalnego ścienienia błony w porównaniu do błony niezaburzonej. Wnioskujemy stąd, że pomiędzy błoną zawierającą cholesterol a APP oraz centrum katalitycznym h69  $\gamma$ -sekretaży występuje wyraźne ujemne niedopasowanie hydrofobowe. W konsekwencji, asocjacja APP do  $\gamma$ -sekretaży prowadzi do zmniejszenia obszaru zaburzenia błony. Korzystając z teorii napięcia liniowego, pokazałem, że niedopasowanie hydrofobowe odgrywa dominującą rolę w wiązaniu APP do  $\gamma$ -sekretaży, które zachodzi bez udziału specyficznych oddziaływań między nimi.

W zgodzie z powyższym mechanizmem, usunięcie cholesterolu z błony DPPC prowadzi do obniżenia powinowactwa APP do  $\gamma$ -sekretaży. Wynika to ze zmniejszenia grubości błony w otoczeniu APP, w porównaniu do niezaburzonej błony DPPC, przy jednoczesnym braku zmian w grubości błony w sąsiedztwie h69. To sugeruje, że niedopasowanie hydrofobowe występuje wyłącznie w otoczeniu APP, podczas gdy w otoczeniu h69 nie obserwujemy tego zjawiska.

#### **Agregacja koniugatów peptyd-antybiotyków w obrębie błon lipidowych**

Jak wspominałem w podrozdziale 1.6.3 innowacyjną grupą czynników cytotoksycznych, mogących znaleźć zastosowanie w chemioterapii, są peptydy transbłonowe o działaniu selektywnym, które wykazują większą aktywność wobec komórek nowotworowych



w porównaniu do komórek zdrowych. Ich mechanizm działania polega na zaburzaniu ciągłości błony komórkowej, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki. Przykładem takiego związku jest peptyd transportan 10 (TP10), który wykazuje znaczną selektywność wobec komórek nowotworu szpiku kostnego, raka szyjki macicy czy mięsaka kościopochodnego [188, 189].

Warto zaznaczyć, że typowe chemioterapeutyki wykazują zazwyczaj aktywność zarówno wobec komórek nowotworowych, jak i tych zdrowych komórek, które podlegają stałym podziałom komórkowym, w tym komórek układu immunologicznego. W związku z tym chemioterapia prowadzi do upośledzenia odporności i zwiększa ryzyko infekcji mikrobiologicznych. Aby zminimalizować to ryzyko, podczas chemioterapii równocześnie podaje się antybiotyki, m.in. z grupy fluorochinolonów, takie jak lewofloksacyna (LVX).

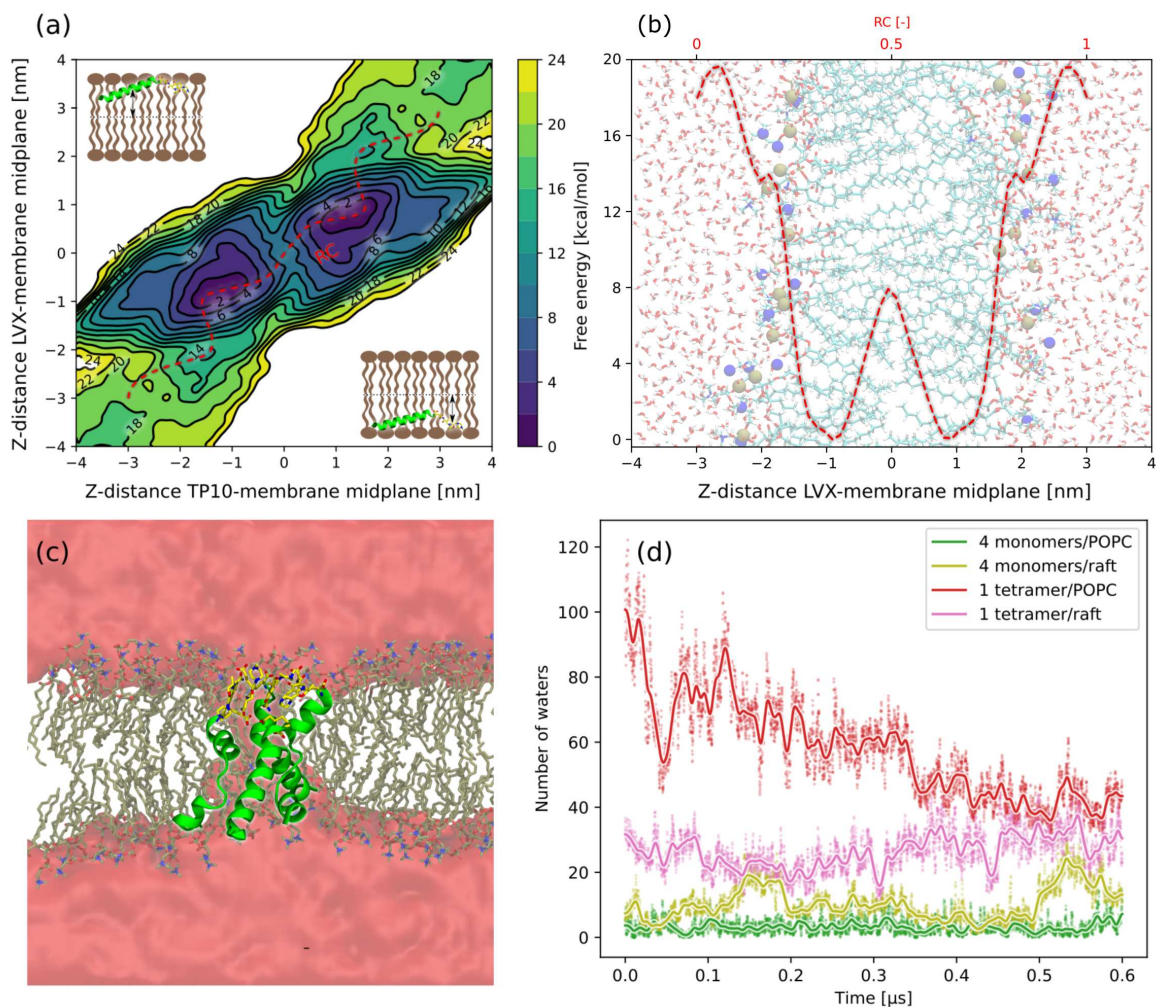
Mimo zastosowania kompleksowego leczenia chemioterapią i antybiotykami, umieralność na nowotwory szpiku kostnego i związane z nim powikłania utrzymuje się na poziomie 20–40% [86]. Co więcej, przedłużona terapia antybiotykami z grupy fluorochinolonów może prowadzić do stresu oksydacyjnego, co z kolei prowadzi do utleniania lipidów, a także zaburzenia struktury białek i DNA.

Zespół badawczy pod kierownictwem prof. Krzysztofa Rolki z Uniwersytetu Gdańskiego prowadzi badania nad nowymi związkami o charakterze koniugatów, które mogą znaleźć zastosowanie m.in. w efektywnym leczeniu ostrej białaczki szpikowej. Jednym z tych koniugatów jest związek TP10–NH<sub>2</sub>–LVX oraz jego modyfikacje. Składa się z peptydu TP10, którego N-koniec, zawierający mostek disiarczkowy, połączony jest z LVX poprzez grupę karboksylową (patrz: Rys. 1.4), a C-koniec zawiera ugrupowanie amidowe. Wyniki eksperymentów wykazały, że koniugat zachowuje zarówno właściwości cytotoksyczne peptydu TP10, jak i przeciwbakteryjne niezmodyfikowanej LVX [93, 94]. Co więcej, stwierdzono, że koniugat TP10–NH<sub>2</sub>–LVX wywołuje znacznie mniejszy stres oksydacyjny niż niezmodyfikowana LVX.

Stąd istotne było zbadanie mechanizmu cytotoksyczności koniugatu TP10–NH<sub>2</sub>–LVX w kontekście jego potencjalnego działania przeciwnowotworowego. Poznanie tego mechanizmu ułatwiłoby dalszy rozwój tej klasy chemioterapeutyków. Moim zadaniem było zbadanie molekularnego mechanizmu działania koniugatów na błonę lipidową oraz określenie, w jaki sposób mogą one wpływać na zaburzanie ciągłości błony lipidowej, co sugerowały dotychczasowe badania [91].

W pierwszej kolejności, aby uzyskać odpowiedź na pytanie dotyczące powinowactwa i preferowanego ułożenia monomerycznej formy TP10–NH<sub>2</sub>–LVX w błonie, przeprowadziłem obliczenia mające na celu określenie zmian energii swobodnej towarzyszących przeniesieniu koniugatu w poprzek dwuwarstwy lipidowej POPC. W tym celu wyznaczyłem dwuwymiarową mapę energii swobodnej (Rys. 4.36a), gdzie jedna ze współrzędnych reakcji opisywała odległość rzutowaną na oś prostopadłą do powierzchni błony (Z-odległość) między

LVX a środkiem błony, zaś druga współrzędna opisywała Z-odległość między peptydem a środkiem błony.



**Rys. 4.36:** Wyniki uzyskane w symulacjach dynamiki molekularnej koniugatu TP10-NH<sub>2</sub>-LVX. (a) Dwuwymiarowa mapa opisująca energetykę przeniesienia koniugatu w funkcji odległości TP10 od środka błony (oś pozioma) oraz odległości LVX od środka błony (oś pionowa). Obie odległości zostały dodatkowo zrzutowane na oś normalną do powierzchni błony. (b) Profil energii swobodnej porównujący energetyczny koszt przeniesienia koniugatu w poprzek błony POPC. (c) Reprezentatywna klatka ukazująca tworzenie się kanału wodnego w błonach POPC zawierających tetramer TP10-NH<sub>2</sub>-LVX. Obszar, w którym średnia gęstość cząsteczek wody jest większa niż 0.05 g/cm<sup>3</sup>, oznaczyłem kolorem czerwonym. (d) Liczba cząsteczek wody znajdujących się w odległości 0.5 nm od środka błony w funkcji czasu, w układach zawierających cztery rozseparowane przestrzennie monomery TP10-NH<sub>2</sub>-LVX lub jeden tetramer TP10-NH<sub>2</sub>-LVX, w nieuporządkowanej błonie POPC i błonie złożonej z DMPC i cholesterolu o stężeniu 30% mol (raft).

Na Rys. 4.36a możemy zauważyć wyraźne minima energetyczne w odległości około 1.0 nm od środka błony, zarówno dla TP10, jak i LVX. Z kolei wyznaczona przeze mnie średnia odległość grup karbonylowych lipidów od środka błony, stanowiąca połowę grubości warstwy hydrofobowej błony (0.5 D<sub>H</sub>) wyniosła około 1.4 nm. Wskazuje to, że koniugat wykazuje powinowactwo do błony. Dodatkowo, koniugat przyjmuje w błonie orientację równoległą do powierzchni (orientacja horyzontalna), pozostając w kontakcie z polarnym rejonem błony. Wynika to z amfipatycznej budowy helisy TP10, która sprawia, że monomeryczne peptydy preferencyjnie orientują się w błonie tak, by swoją stroną polarną zwracać się w kierunku środowiska wodnego a niepolarną w kierunku wnętrza błony.

Rys. 4.36a ujawnia ponadto obecność lokalnego maksimum energii swobodnej w odległości 0.0 nm (środek błony). Ponownie wskazuje to, że przy niskim stężeniu, przy którym koniugat występuje głównie w formie monomerycznej, nie może on przyjąć orientacji prostopadłej do powierzchni błony. Wyniki sugerują więc, że przy niskim stężeniu, koniugat nie ma możliwości zaburzania ciągłości błony komórkowej.

W celu zrozumienia energetyki wiązania koniugatu z błoną, wyznaczyłem optymalną ścieżkę procesu (RC), czyli krzywą opisującą przeniesienie koniugatu z jednej strony błony (gdzie wartości obu współrzędnych reakcji wynoszą  $-3$  nm) na drugą stronę błony (wartości obu współrzędnych reakcji równe  $3$  nm), wzdłuż ścieżki, dla której wartości energii swobodnej były najniższe. Na Rys. 4.36b widać, że przeniesienie koniugatu ze środowiska wodnego do wnętrza błony (w odległości ok.  $1$  nm od środka błony) skutkuje spadkiem wartości energii swobodnej o około  $20$  kcal/mol. Potwierdza to, że koniugat wykazuje silne powinowactwo do wiązania się z błoną, przechodząc ilościowo ze środowiska wodnego do wnętrza błony.

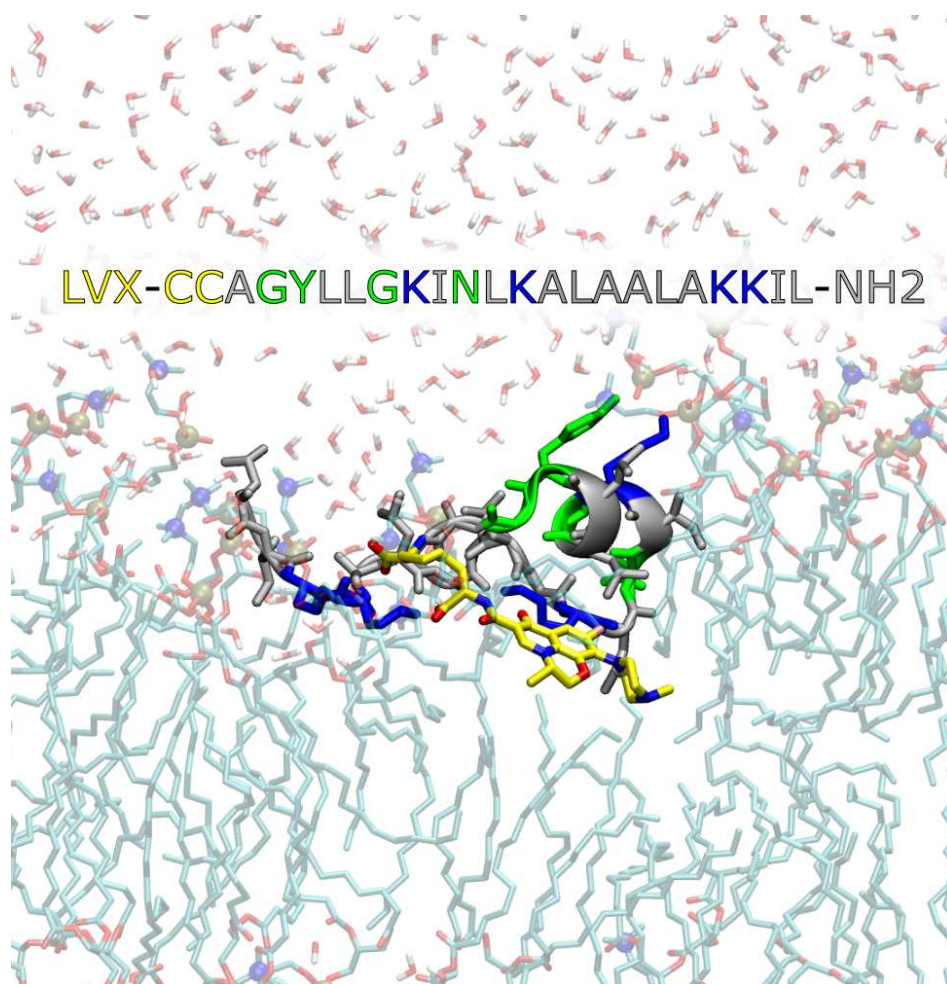
Z Rys. 4.36b możemy również zauważyć, że wysokość bariery energetycznej znajdującej się w środku błony wynosi około  $8$  kcal/mol. Stąd możemy ponownie stwierdzić, że koniugat nie ma możliwości lokowania się w centralnej części błony, co wynika z tendencji cząsteczek zawierających fragmenty polarne do pozostawania w kontakcie z polarnym rejonem błony, co pokazałem na Rys. 4.37. Obecność bariery ogranicza także szybkość transportu koniugatu w poprzek błony.

Postanowiłem dalej sprawdzić, czy dla wyrażenia się aktywności błonowej koniugatu TP10-NH<sub>2</sub>-LVX niezbędna jest jego oligomeryzacja. W tym celu przeprowadziłem symulację dynamiki molekularnej, w której w błonie POPC obecne były cztery cząsteczki koniugatu, tworzące tetramer (Rys. 4.36c).

W celu oceny wpływu tetrameryzacji na ciągłość błony, przeprowadziłem analizę gęstości wody w zależności od odległości od środka błony POPC. Gęstość wody uśredniałem po obszarze, dla którego odległość od środka masy tetramery, rzutowana na płaszczyznę równoległą do powierzchni błony, nie przekraczała  $2.5$  nm. Uzyskaną przez mnie gęstość wody dla błony zawierającej tetramer porównałem z analogicznym wynikiem dla błony niezaburzonej. Wyniki zostały uśrednione dla całej trajektorii w obu przypadkach.

Z Rys. 4.38 widzimy, że dla niezaburzonej błony gęstość wody w jej środku wynosi  $0$  co zgodnie z oczekiwaniami wskazuje na bardzo niską przepuszczalność błony POPC dla cząsteczek wody. Natomiast po umieszczeniu w niej tetramery TP10-NH<sub>2</sub>-LVX gęstość wody w środku błony wzrasta do około  $0.05$  g/cm<sup>3</sup>. Wniosujemy z tego, że w otoczeniu tetramery pojawia się obszar nieciągłości błony, co sugeruje obecność stabilnego kanału wodnego. Dodatkowo zostało to zobrazowane na Rys. 4.36c. Stabilność kanału wodnego jest efektem zorientowania polarnych fragmentów koniugatów w kierunku środka kanału. To umożliwia swobodny przepływ cząsteczek wody przez kanał na drugą stronę błony.

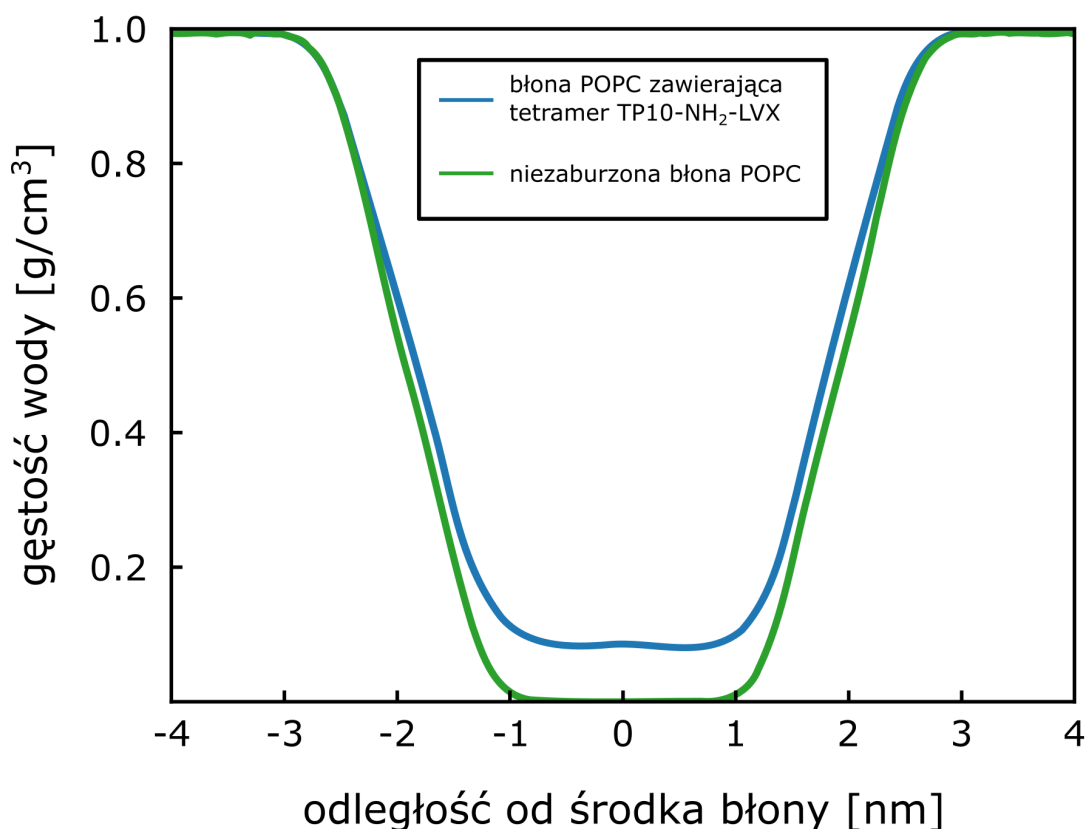




**Rys. 4.37:** Reprezentatywna klatka z symulacji dynamiki molekularnej przedstawiająca koniugat TP10-NH<sub>2</sub>-LVX w orientacji dominującej w błonie POPC (jasny niebieski). Kolorem żółtym oznaczony jest fragment zawierający LVX oraz dwie reszty cysteinowe, tworzące mostek disiarczkowy. Reszty aminokwasowe o charakterze niepolarnym oznaczone zostały kolorem szarym, o charakterze polarnym – kolorem zielonym, a reszty naładowane dodatnio – kolorem niebieskim.

Na Rys. 4.36c możemy zaobserwować, że koniugaty tworzące tetramer przyjmują w błonie przechyloną orientację, co sugeruje obecność dodatniego niedopasowania hydrofobowego między koniugatem a błoną. Aby to zweryfikować, oszacowałem długość części peptydowej koniugatu, która wyniosła około 3.8 nm. Z kolei grubość rdzenia hydrofobowego błony POPC D<sub>h</sub> wyniosła 2.8 nm, co oznacza, że wartość ΔD wyniosła 1.0 nm. Możemy zatem spekulować, że oligomeryzacja TP10-NH<sub>2</sub>-LVX jest korzystna nie tylko ze względu na możliwość tworzenia korzystnych oddziaływań między częściami polarnymi peptydów ze sobą, ale także w celu minimalizacji niekorzystnego efektu niedopasowania hydrofobowego.

Postanowiłem następnie zbadać, czy selektywność działania koniugatu może wynikać ze składu lipidowego, który determinuje różne właściwości błony. W tym celu przeanalizowałem stabilność kanału wodnego zbudowanego z tetrameru TP10-NH<sub>2</sub>-LVX w różniących się warunkach: i) w błonie zbudowanej z nienasyconego lipidu POPC o niskim upakowaniu hydrofobowego rdzenia oraz ii) w błonie złożonej z nasyconych lipidów DMPC i cholesterolu (w stężeniu 30% mol), charakteryzującej się wysokim upakowaniem rdzenia.



**Rys. 4.38:** Wyznaczone gęstości wody w zależności od odległości od środka błony POPC w przypadku obecności tetramery TP10-NH<sub>2</sub>-LVX oraz dla niezaburzonej błony. Dla błony zawierającej tetramer obliczyłem gęstość wody w obszarze, dla którego odległość od środka masy tetramery, zrzutowana na płaszczyznę równoległą do powierzchni błony, nie przekracza 2.5 nm. Z wykresu można zauważyć, że umieszczenie tetramery w błonie powoduje wzrost gęstości wody w odległości mniejszej niż 1 nm od środka błony, co sugeruje pojawienie się kanału wodnego.

Ponadto, aby sprawdzić, czy oligomeryzacja koniugatów jest konieczna do tworzenia stabilnych porów wodnych, przeprowadziłem symulacje dla każdej z tych błon, w których cztery monomery, zorientowane transbłonowo, były odseparowane od siebie na odległość około 2 nm.

Jak wspominałem, Rys. 4.38 i 4.36c sugerują obecność kanałów wodnych na podstawie gęstości cząsteczek wody w środku błony. Z tego powodu, w celu ustalenia istnienia kanałów wodnych oraz porównania ich wielkości między obiema błonami (POPC i DMPC/chl), wyznaczyłem liczbę cząsteczek wody znajdujących się w odległości 0.5 nm od środka błony w funkcji czasu.

Z Rys. 4.36d widać, że dla tetramery umieszczonego w błonie POPC liczba cząsteczek wody maleje w ciągu pierwszych 0.3  $\mu$ s od około 100 do 50. Obserwowany początkowy spadek sugeruje, że w tym czasie doszło do częściowej reorganizacji cząsteczek TP10-NH<sub>2</sub>-LVX w obrębie tetramery, co związane było ze stabilizacją struktury tetramery. Rzeczywiście, po około 0.3  $\mu$ s obserwujemy ustabilizowanie się liczby cząsteczek wody wewnątrz

kanalu. Wynik ten potwierdza obecność stabilnego kanału wodnego, co pokazałem również na Rys. 4.38.

Dla tetrameru znajdującego się w błonie zawierającej DMPC i cholesterol, widzimy, że początkowa liczba cząsteczek wody znajdujących się w środku błony wynosi około 30. Po ok. 0.5  $\mu$ s liczba ta wzrasta do około 40 i następnie utrzymuje się na stałym poziomie. Możemy więc twierdzić, że tetramer tworzy stabilny kanał wodny także w błonie o wysokim uporządkowaniu.

Porównanie liczby cząsteczek wody wewnątrz zrelaksowanych tetramerów w obu błonach ( $> 0.5 \mu$ s) wskazuje, że kanały w błonie POPC są tylko nieznacznie szersze niż w błonie DMPC/chl. Możemy zatem przypuszczać, że rozmiar tych kanałów wodnych nie jest istotnie zależny od upakowania lipidów.

W przypadku czterech odseparowanych monomerów w obu błonach możemy zauważyć, że przez większość czasu liczba cząsteczek wody w środku błony jest niewielka, co wskazuje, że oligomeryzacja koniugatów jest niezbędna do utworzenia stabilnych kanałów wodnych. Jednakże w przypadku błony zawierającej DMPC i cholesterol, w porównaniu do błony POPC, obserwujemy pewien wzrost liczby cząsteczek wody po około 0.5  $\mu$ s. Ten wzrost jest wynikiem rozpoczęcia się oligomeryzacji koniugatów w uporządkowanej błonie. To z kolei może sugerować, że agregaty mogą chętniej tworzyć się w błonach o większym upakowaniu, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami dotyczącymi stabilności asocjacji zawierających modelowe inkluzje.

Na tej podstawie możemy spekulować, że przyczyny aktywności koniugatów TP10–NH<sub>2</sub>–LVX wobec komórek białaczkowych nie leżą w stabilności agregatów TP10–NH<sub>2</sub>–LVX w błonach o różnym stopniu upakowania lipidów. Dlatego też przyczyny aktywności TP10–NH<sub>2</sub>–LVX wobec komórek leżą najprawdopodobniej gdzie indziej, np. wynikają ze zróżnicowanego oddziaływania z białkami błonowymi komórek nowotworowych i zdrowych.

Podsumowując, koniugat LVX–NH<sub>2</sub>–LVX wykazuje bardzo silną skłonność do wiązania się z błoną, przyjmując w niej horyzontalną orientację względem powierzchni błony i pozostając w kontakcie z rejonem polarnym błony. Uzyskane wyniki sugerują, że przy niskim stężeniu koniugatu nie obserwuje się zaburzeń ciągłości błony lipidowej. Natomiast przy wyższym stężeniu koniugatu możliwe jest tworzenie kanałów wodnych w błonie poprzez agregację TP10–NH<sub>2</sub>–LVX. Ponadto, wyniki sugerują, że na stabilność agregatów TP10–NH<sub>2</sub>–LVX wpływa dodatnie niedopasowanie hydrofobowego. Z drugiej strony, stabilność kanałów wodnych złożonych z agregatów TP10–NH<sub>2</sub>–LVX nie zależy od składu lipidowego błony.

#### 4.5.2 Wpływ alkoholi na właściwości fizykochemicznych dwuwarstwy lipidowej

Podobnie jak sterole cząsteczki alkoholi mają zdolność do wypełniania przestrzeni pomiędzy cząsteczkami lipidów, jednocześnie oddziałując z polarnym rejonem błony za pośrednictwem grupy hydroksylowej. Jak wspominałem w podrozdziale 1.6.4, badania



przeprowadzone przez zespół prof. V.A. Raghunathana (Raman Research Institute) pozwoliły ustalić, że długość hydrofobowa dodawanego alkoholu istotnie wpływa na charakter zmian wywoływanych we właściwościach fizykochemiczne błony. Dodatek krótkich alkoholi prowadzi do obniżenia temperatury przejścia fazowego  $T_m$  oraz zmniejszenia grubości błony, podczas gdy dodatek długich alkoholi prowadzi do podwyższenia  $T_m$  oraz zwiększenia grubości błony.

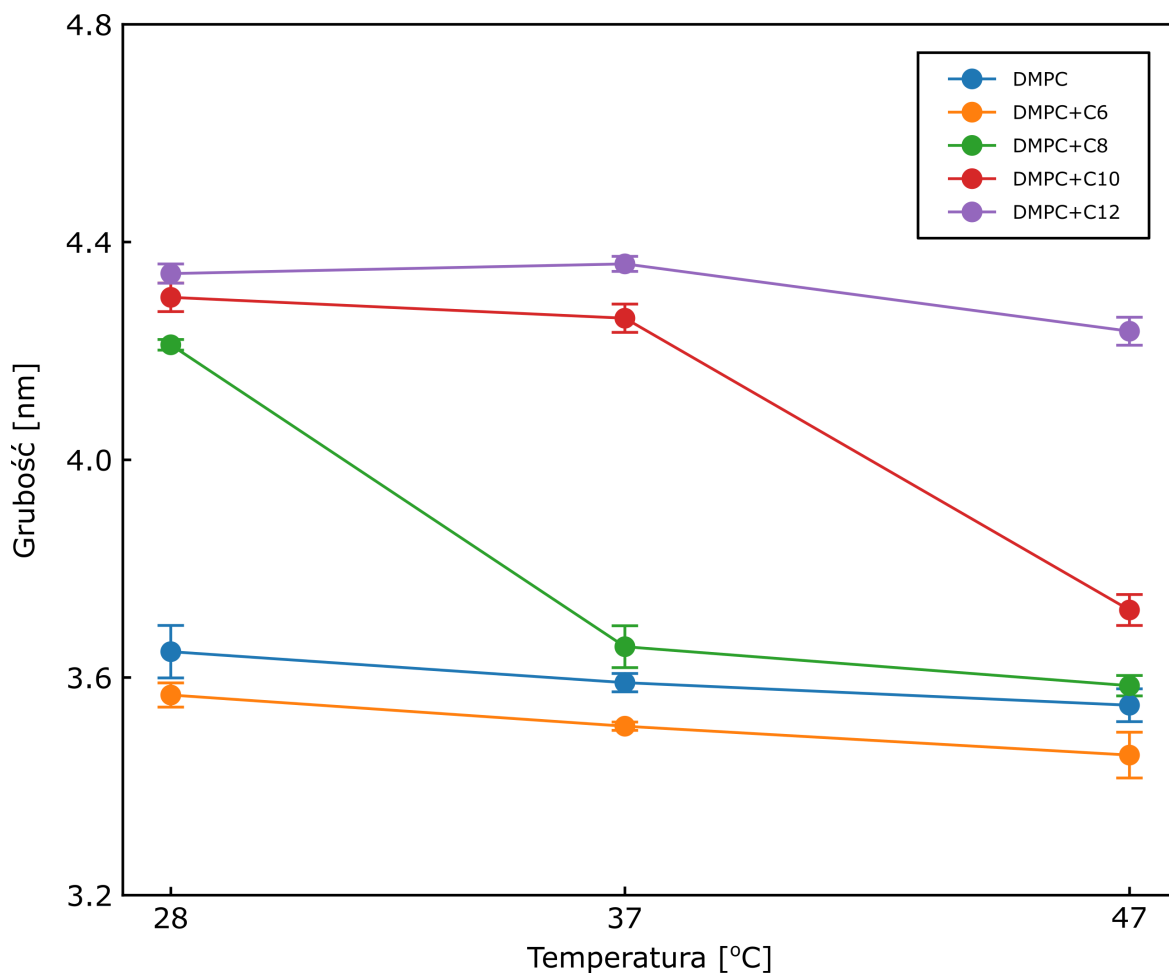
Molekularne podłoże różnic w odpowiedzi błony na dodatek alkoholi o różnej długości nie zostało dotąd jednoznacznie ustalone. W związku z tym wykorzystałem symulacje molekularne, aby znaleźć odpowiedź na pytanie, dlaczego błony lipidowe reagują znacząco inaczej na dodatek krótko- i długołańcuchowych alkoholi. W tym celu przeprowadziłem symulacje równowagowe (o długości 2  $\mu$ s każda) hydratowanych dwuwarstw lipidowych zawierających fosfolipidy DMPC (di-14:0 PC) oraz jeden z alkoholi: i) heksanol (C6), ii) oktanol (C8), iii) dekanol (C10), iv) dodekanol (C12), w stosunku molowym lipid:alkohol równym 2:1. Porównawczo, przeprowadziłem także symulacje dla błony DMPC pozbawionej alkoholi. Symulacje te zostały przeprowadzone niezależnie w trzech różnych temperaturach (28, 37 oraz 47°C).

W pierwszej kolejności postanowiłem ustalić, czy podobnie jak w eksperymencie, domieszkowanie błony DMPC cząsteczkami alkoholi spowoduje znaczące zmiany grubości błony oraz temperatury przejścia między fazą żelową a fazą ciekłą ( $T_m$ ). W tym celu wyznaczyłem profile gęstości grup fosforanowych w funkcji odległości od środka błony, z których wyznaczyłem średnie odległości między maksimami, które umownie przyjmuje się często za grubość błony (Rys. 4.39). W przypadku czystej błony DMPC grubość zmienia się od 3.65 do 3.55 nm wraz ze wzrostem temperatury od 28 do 47°C. W każdej z tych temperatur błona ta pozostawała w fazie ciekłej, na co wskazują wyznaczone przeze mnie współczynniki dyfuzji lipidów, osiągające wartości około 1  $\mu$ m/s [190]. Uzyskane przeze mnie średnie grubości błon i współczynniki dyfuzji, które wskazują na utrzymanie się błony DMPC w fazie ciekłej w temperaturach badania od 28 do 47°C, są zgodne z ustaleniami uzyskanymi w badaniach kalorymetrycznych [191].

W przypadku błon domieszkowanych heksanolem (DMPC+C6), grubość błony zmniejszyła się do 3.57 nm w temperaturze 28°C oraz do 3.46 nm w temperaturze 47°C. Widać zatem, że dodatek krótkich alkoholi (takich jak C6) prowadzi do zmniejszenia grubości w porównaniu z błoną czystą, co jest także zgodne z wynikami pomiarów eksperymentalnych.

Inaczej niż dla DMPC+C6, w przypadku błony DMPC+C8 grubość w temperaturze 28°C zwiększyła się znacząco do wartości 4.21 nm, podczas gdy w temperaturach 37°C i 47°C zmiana ta była nieznaczna (wzrost, odpowiednio, o 0.07 i 0.03 nm). Znaczący wzrost grubości w 28°C wskazuje na przejście błony do fazy żelowej w tych warunkach. Znajduje to także potwierdzenie w o dwa rzędy niższych wartościach współczynnika dyfuzji lipidów ( $\sim 10^{-2}$   $\mu$ m/s). W temperaturach 37°C i 47°C współczynnik dyfuzji lipidów wynosił około





Rys. 4.39: Średnie grubości błony DMPC domieszkowanej cząsteczkami alkoholi w funkcji temperatury. Dla porównania wyniki te zostały zestawione z analogicznymi wynikami dla błony DMPC nie zawierającej alkoholi.

$10^0 \mu\text{m/s}$ , co oznacza, że przy wyższych temperaturach niewielka zmiana grubości dobrze odpowiada z niewielkimi zmianami wartości współczynnika dyfuzji lipidów. Na podstawie analizy grubości błony oraz współczynników dyfuzji lipidów w każdej z temperatur możemy wnioskować, że domieszkowanie błony alkoholami C8 skutkuje podniesieniem temperatury przejścia fazowego  $T_m$ , ponieważ w temperaturze  $28^\circ\text{C}$  błona DMPC+C8 znajdowała się w fazie żelowej, podczas gdy błona DMPC znajdowała się w fazie ciekłej.

W przypadku błony domieszkowanej dekanolem (DMPC+C10) grubość błony wynosiła  $4.30 \text{ nm}$  w temperaturze  $28^\circ\text{C}$ , zmniejszając się do wartości  $4.26 \text{ nm}$  w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  oraz do wartości  $3.72 \text{ nm}$  w temperaturze  $47^\circ\text{C}$ . To sugeruje, że błona DMPC+C10 znajdowała się w fazie ciekłej tylko przy  $47^\circ\text{C}$ , a jej grubość była o  $0.17 \text{ nm}$  większa niż w przypadku błony niedomieszkowanej alkoholami. Widzimy również, że dodatek C10, w porównaniu z C8, istotnie podnosi wartość  $T_m$ , gdyż przy  $37^\circ\text{C}$  błona DMPC+C10 była w fazie żelowej, podczas gdy błona DMPC+C8 była w fazie ciekłej. Co więcej, analizując grubości ciekłych błon przy  $47^\circ\text{C}$  widzimy, że domieszkowanie

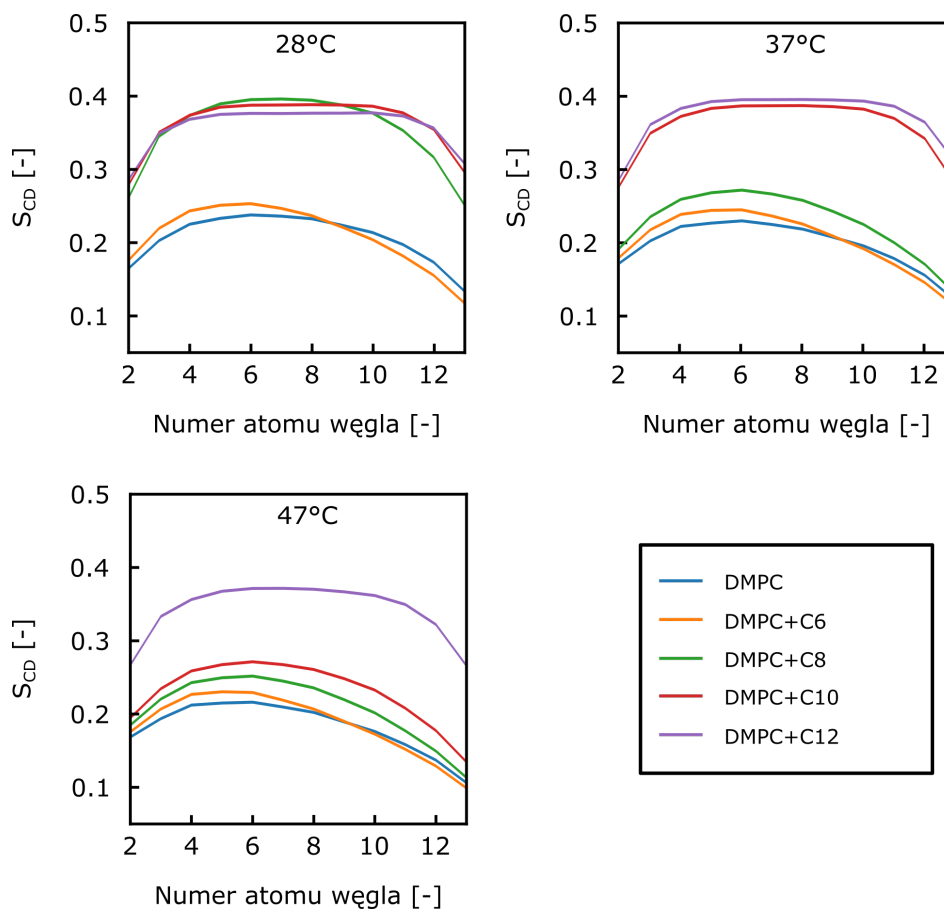
C10 powoduje znaczne pogrubienie błony DMPC (o 0.17 nm) podczas gdy C8 powoduje tylko niewielkie zwiększenie grubości (o 0.03 nm). Z kolei dla błony z dodekanolem (DMPC+C12), grubość błony wynosiła 4.34 nm, 4.36 oraz 4.24 nm w temperaturach, odpowiednio, 28°, 37° oraz 47°C. Obserwujemy zatem, że błona DMPC+C12 utrzymywała się w fazie żelowej przy wszystkich badanych temperaturach, co świadczy o jeszcze bardziej znaczącym podwyższeniu  $T_m$  w porównaniu z domieszkowaniem błony alkoholem C10.

Podsumowując, ustaliłem, że średnia grubość niedomieszkowanej błony DMPC wynosi 3.65 nm w 28°C i zmniejsza się do 3.55 nm w 47°C. W całym zakresie badanych temperatur (28–47°C) błona ta pozostawała w stanie ciekłym, co potwierdziły współczynniki dyfuzji lipidów na poziomie około 1  $\mu\text{m/s}$ . Po dodaniu heksanolu, grubość błony wynosiła 3.57 nm w 28°C i malała do 3.46 nm w 47°C. Widać zatem, że błona DMPC domieszkowana heksanolem pozostawała w stanie ciekłym w całym badanym zakresie temperatur, a jej grubość była mniejsza niż w przypadku czystej błony DMPC. Dla układu DMPC+C6 nie zaobserwowałem również wzrostu temperatury przejścia fazowego. Po dodaniu oktanolu do błony DMPC, grubość błony wynosiła 4.21 nm w 28°C i pozostawała w tej temperaturze w stanie żelowym, co potwierdziła wartość współczynnika dyfuzji lipidów. Natomiast w temperaturach 37°C oraz 47°C błona z dodatkiem oktanolu miała grubość, odpowiednio, 3.66 i 3.58 nm oraz pozostawała w tym zakresie temperatur w stanie ciekłym. Porównując błony w fazie ciekłej, widzimy, że dodanie oktanolu do DMPC nieznacznie ją pogrubia. Z drugiej strony, dodanie oktanolu podnosi temperaturę przejścia fazowego. Błona domieszkowana dekanolem miała grubość 4.30 nm w 28°C oraz 4.26 nm w 37°C, pozostając w stanie żelowym w tych temperaturach, a przy 47°C miała grubość 3.72 nm i znajdowała się w stanie ciekłym. Wobec tego, dodatek dekanolu znacząco podnosi temperaturę przejścia fazowego w porównaniu z oktanolem i znacząco pogrubia błonę w stanie ciekłym. Błona z dodatkiem dodekanolu miała grubość 4.34 nm w 28°C, malejąc do 4.24 nm w 47°C. Błona ta pozostawała w stanie żelowym w całym badanym zakresie temperatur. Stąd wniosek, że dodanie dodekanolu podnosi temperaturę przejścia fazowego jeszcze silniej niż dekanol.

Powyższe wyniki symulacji w ogólności zgadzają się z wynikami kalorymetrii skaningowej DSC i małąkątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS). Domieszkowanie błony krótkimi alkoholami prowadzi do zmniejszenia grubości błony i obniżenia  $T_m$ . Z kolei domieszkowanie błony długimi alkoholami powoduje zwiększenie grubości błony oraz podwyższenie  $T_m$ . Główna rozbieżność pomiędzy wynikami doświadczalnymi i teoretycznymi występuje w przypadku błony DMPC+C8 w temperaturze 28°C. Pomiary DSC wskazują bowiem, że błona ta znajduje się w fazie ciekłej, podczas gdy w symulacji błona ta w 28°C przechodzi samorzutnie do fazy żelowej. Wyniki symulacji wskazują zatem, że dodatek C8 do błony DMPC podnosi temperaturę przejścia  $T_m$ , podczas gdy wyniki uzyskane za pomocą DSC wykazują obniżenie  $T_m$ . Rozbieżność ta może

wynikać z przeszacowania przyciągających oddziaływań dyspersyjnych pomiędzy lipidami w zastosowanym przez mnie polu siłowym [192].

Aby uzyskać dodatkowe informacje na temat czynników wpływających na zmiany grubości błony w wyniku dodatku alkoholi o różnych długościach łańcucha, wyznaczyłem parametr uporządkowania  $S_{CD}$  dla łańcuchów acylowych DMPC we wszystkich symulowanych układach.



**Rys. 4.40:** Zależność współczynnika uporządkowania  $S_{CD}$  od numeru atomu węgla w łańcuchach acylowych lipidów DMPC (2--13) w poszczególnych symulowanych błonach domieszkowanych alkoholami (legenda). Wartości  $S_{CD}$  przekraczające 0.3 wskazują na to, że błona znajduje się w fazie żelowej, podczas gdy wartości mniejsze od 0.3 wskazują na fazę ciekłą. Domieszkowanie błony DMPC heksanolem (C6) skutkuje zwiększeniem uporządkowania łańcuchów lipidowych w zakresie 2--9 w porównaniu do czystej błony DMPC, przy jednoczesnym obniżeniu uporządkowania w zakresie 10--13. Z kolei domieszkowanie błony oktanolem (C8), dekanolem (C10) i dodekanolem (C12) powoduje zwiększenie wartości  $S_{CD}$  wzdłuż całej długości łańcuchów acylowych. Wzrost uporządkowania jest tym większy, im dłuższy jest łańcuch węglowy dodawanego alkoholu.

Rys. 4.40 pokazuje, że wartości współczynników  $S_{CD}$  dla błony DMPC utrzymywały się w zakresie 0.11–0.23 we wszystkich badanych temperaturach. W przypadku dodatku alkoholi C6 do błony, wartości  $S_{CD}$  mieściły się w zakresie 0.10–0.25 we wszystkich badanych temperaturach. Z Rys. 4.40 możemy również zauważyć, że wpływ C6 na uporządkowanie lipidów jest bardziej złożony. Z jednej strony obserwujemy, że dodatek C6 do DMPC zwiększa uporządkowania atomów węgla C<sub>2</sub>–C<sub>9</sub> (licząc od atomu węgla karboksylowego). Z drugiej strony obserwujemy spadek uporządkowania w porównaniu do



błony DMPC dla atomów węgla zlokalizowanych na końcu łańcucha ( $C_{10}$ – $C_{13}$ ). To może tłumaczyć, dlaczego błona DMPC+C6 jest cieńsza niż DMPC (patrz: Rys. 4.39).

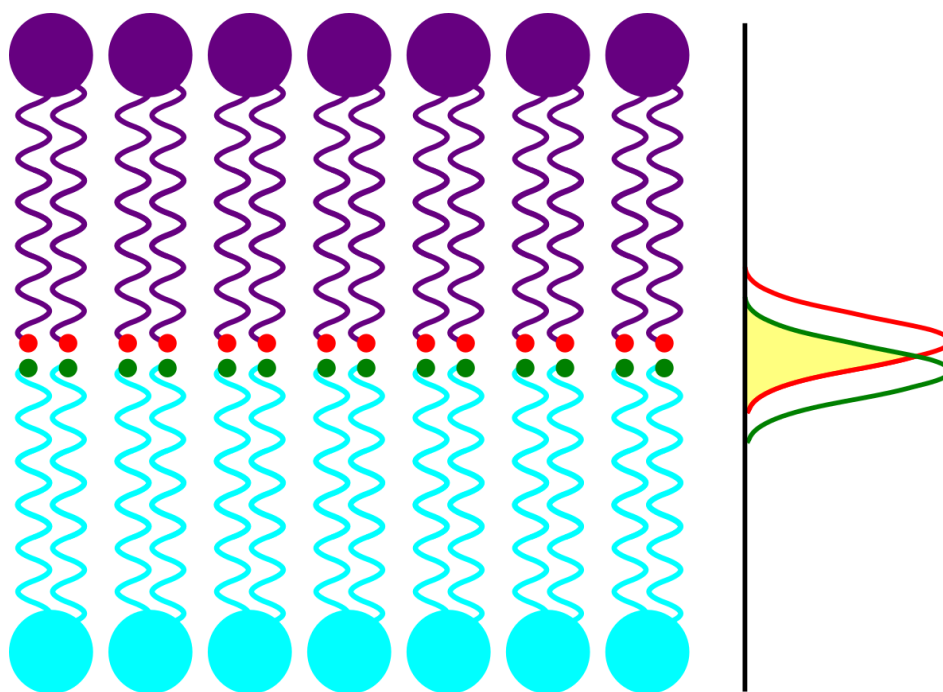
W przypadku błony DMPC+C8, wartości  $S_{CD}$  zawierały się w przedziale 0.25–0.40 przy 28°C oraz 0.12–0.27 przy 37°C oraz 47°C. Wysokie wartości współczynnika  $S_{CD}$  przy 28°C wskazują na wysokie uporządkowanie konformacyjne łańcuchów lipidowych, charakterystyczne dla błon w fazie żelowej. Z kolei znaczący spadek  $S_{CD}$  przy wyższych temperaturach wskazuje na obecność błony w fazie ciekłej. Porównując współczynniki  $S_{CD}$  dla błon DMPC i DMPC+C8 przy 47°C, widzimy, że dodatek alkoholu C8 spowodował zwiększenie uporządkowania konformacyjnego lipidów ( $S_{CD} \in (0.11–0.25)$ ) w porównaniu do błony niezawierającej alkoholu ( $S_{CD} \in (0.12–0.22)$ ). To z kolei wyjaśnia wzrost grubości błony DMPC pod wpływem domieszkowania jej alkoholami C8.

Dla błony DMPC+C10, wartości współczynnika  $S_{CD}$  zawierały się w przedziale 0.28–0.39 przy 28°C i 37°C, a zmniejszały się do 0.14–0.27 przy 47°C. Te wyniki potwierdzają, że błona DMPC+C10 znajdowała się w fazie żelowej aż do temperatury 37°C, zgodnie z analizami grubości błony i współczynników dyfuzji lipidów. Przy 47°C, gdy błona DMPC+C10 była w fazie ciekłej, charakteryzowała się większym uporządkowaniem ( $S_{CD} \in (0.14–0.27)$ ) niż błona DMPC+C8 ( $S_{CD} \in (0.11–0.25)$ ). To wskazuje, że alkohole C10 w znacznie bardziej porządkują błonę, w porównaniu z alkoholami C8.

Dla błony DMPC+C12 wartości współczynnika  $S_{CD}$  zawierała się w przedziale 0.29–0.39 we wszystkich badanych temperaturach, potwierdzając, że błona utrzymywała się w fazie żelowej.

Podsumowując, domieszkowanie błony alkoholami C6 skutkowało zwiększeniem uporządkowania konformacyjnego lipidowych atomów węgla  $C_2$ – $C_9$ , jednocześnie zmniejszając uporządkowanie dla atomów węgla na końcu łańcucha acylowego ( $C_{10}$ – $C_{13}$ ), w efekcie czego obserwujemy zmniejszenie grubości błony względem błony nie domieszkowanej alkoholami (Rys. 4.39). Natomiast domieszkowanie błony C8, C10 oraz C12 istotnie zwiększało uporządkowanie błony we wszystkich temperaturach. To zwiększone uporządkowanie jest kluczowym czynnikiem przyczyniającym się do zwiększenia grubości błony DMPC w porównaniu do błony niedomieszkowanej alkoholami.

Niespodziewane zmniejszenie uporządkowania terminalnych atomów węgla w błonie DMPC+C6, zilustrowane na Rys. 4.40, zmotywowało mnie do zbadania stopnia, w jakim terminalne atomy węgla DMPC z obu listków błony nakładają się na siebie we wszystkich błonach, co przedstawiłem schematycznie na Rys. 4.41. W tym celu wyznaczyłem profile gęstości prawdopodobieństwa (patrz: Rys. 4.42) terminalnych atomów węgla  $C_{14}$  (zarówno sn-1, jak i sn-2) względem osi normalnej do powierzchni błony w temperaturze 47°C. W każdym z przypadków zestawiałem profil gęstości terminalnych atomów węgla w błonie domieszkowanej alkoholami z analogicznym profilem dla błony pozbawionej alkoholu (Rys. 4.42). Dodatkowo, na wykresie przedstawiłem profile gęstości wszystkich atomów węgla w cząsteczkach alkoholu.



**Rys. 4.41:** Schemat przedstawiający sposób oceny stopnia nakładania się warstw lipidowych między sobą. Terminalne atomy węgla lipidów są oznaczone na schemacie czerwonymi i zielonymi kółkami, a gęstości prawdopodobieństwa dla ich położenia wzdłuż osi normalnej do błony zostały przedstawione w postaci krzywych po prawej stronie. Obszar wspólny pod krzywymi gęstości został zaznaczony na żółto.

Rys. 4.42 wskazuje, że pod wpływem domieszkowania alkoholami dochodzi nie tylko do zmian w wysokości maksimum gęstości terminalnych atomów węgla, ale też do przesunięcia położenia tych maksimum względem środka błony. W szczególności, w błonie DMPC+C6 maksima są niższe, a ich położenie przesunięte są w kierunku mniejszych wartości w porównaniu do błony DMPC. W przypadku DMPC+C8 położenie maksimum przesunięte jest nieznacznie w kierunku mniejszych odległości od środka błony, przy jednocześnie znacznie większych ich wysokościach względem błony DMPC. Natomiast w błonach DMPC+C10 i DMPC+C12, obserwujemy przesunięcie położenia maksimum w kierunku wyższych wartości, przy jednoczesnym wzroście wysokości tych maksimum w porównaniu do błony DMPC.

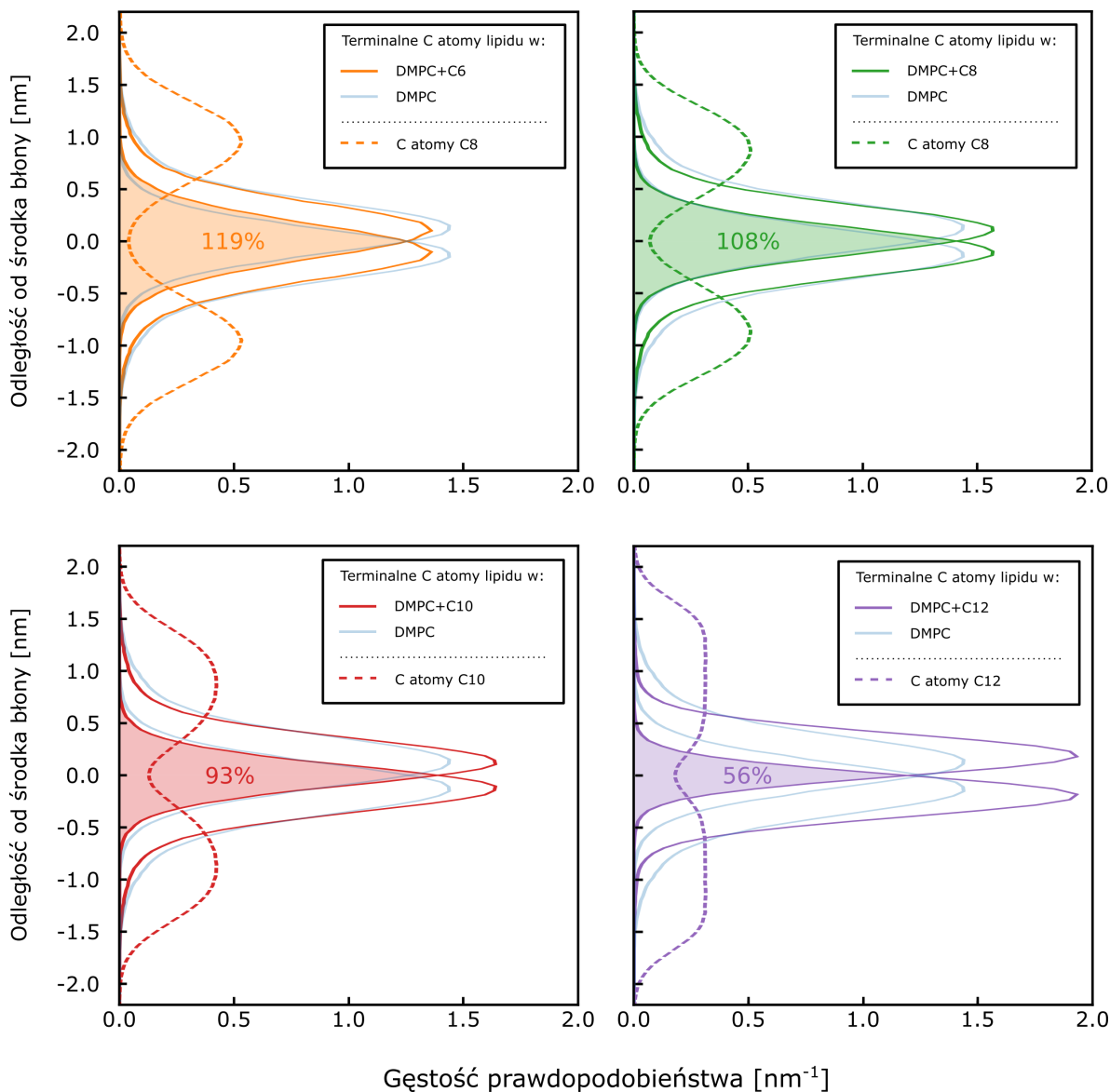
Obserwowane zmiany w profilach gęstości terminalnych atomów węgla lipidów wskazują na zmniejszające się nakładanie łańcuchów acylowych z obu warstw błony wraz ze wzrostem długości łańcucha w cząsteczce alkoholu. Aby bardziej precyzyjnie scharakteryzować stopień nakładania się łańcuchów lipidowych między warstwami, wyznaczyłem wspólną część rozkładów terminalnych atomów węgla z górnej i dolnej warstwy błony (patrz: Rys. 4.41). Wartości procentowe przedstawione na rysunku 4.42 reprezentują względną zmianę stopnia nakładania się lipidów w błonach wzbogaconych alkoholem w porównaniu do czystej błony DMPC.

W przypadku błony DMPC+C6, obserwowane nakładanie się lipidów jest około 1.2 raza wyższe niż w przypadku błony DMPC. Ten wynik koresponduje z zaobserwowanym spadkiem uporządkowania terminalnych atomów węgla w łańcuchach acylowych lipidów





(Rys. 4.40). W związku z tym stwierdzamy, że zwiększone nakładanie się łańcuchów lipidowych powoduje zmniejszenie uporządkowania konformacyjnego terminalnych atomów węgla łańcuchów acylowych. W rezultacie, obserwujemy zmniejszenie grubości błony indukowane dodatkiem C6.



**Rys. 4.42:** Profile gęstości terminalnych atomów węgla DMPC ( $C_{14}$ ) w układach zawierających poszczególne alkohole, w temperaturze  $47^{\circ}\text{C}$ . Profile zostały zestawione z analogiczną krzywą dla błony DMPC pozbawionej alkoholu. Wartości procentowe informują o względnej zmianie nakładania się profili gęstości między górnym a dolnym listkiem w stosunku do czystego DMPC. Ponadto, przerywanymi liniami pokazałem profile gęstości wszystkich atomów węgla w alkoholach.

Warto również zauważyć, że profile gęstości węgla C6 (Rys.4.42) są wyraźnie oddzielone od siebie. Wskazuje to na pojawienie się ujemnego niedopasowania hydrofobowego, czyli różnicy między długością C6, a długością hydrofobowego fragmentu DMPC. Prowadziłoby to do powstania w centralnym rejonie błony niekorzystnych energetycznie pustych przestrzeni. W celu minimalizacji tego kosztu energetycznego przestrzenie te zostają wypełnione przez łańcuchy acylowe lipidów, co z kolei wymaga obniżenia ich



uporządkowania konformacyjnego i prowadzi do obserwowanego spadku  $S_{CD}$  terminalnych atomów węgla. Efekt ten tłumaczy zwiększone nakładanie się łańcuchów DMPC w wyniku domieszkowania błony C6.

Dla błony DMPC+C8, nakładanie się lipidów jest około 1.1 raza większe niż w błonie DMPC. Ze względu na dwa dodatkowe atomy węgla w łańcuchu, profile gęstości C8 są szersze w porównaniu do C6 oraz nieznacznie zachodzą na siebie, co wskazuje na niewielkie nakładanie się łańcuchów alkoholu między warstwami błonowymi. Wobec tego możemy wnioskować, że domieszkowanie błony alkoholami C8 powoduje pojawienie się znacznie mniejszego ujemnego niedopasowania hydrofobowego niż w przypadku C6. W efekcie nie obserwuje się w błonie DMPC+C8 powstawania pustych przestrzeni, których wypełnienie wymagałoby zmniejszenia uporządkowania konformacyjnego terminalnych atomów węgla łańcuchów acylowych DMPC. Z tego powodu obserwujemy wyłącznie wzrost uporządkowania lipidowych acyli, prowadzący do zwiększenia grubości.

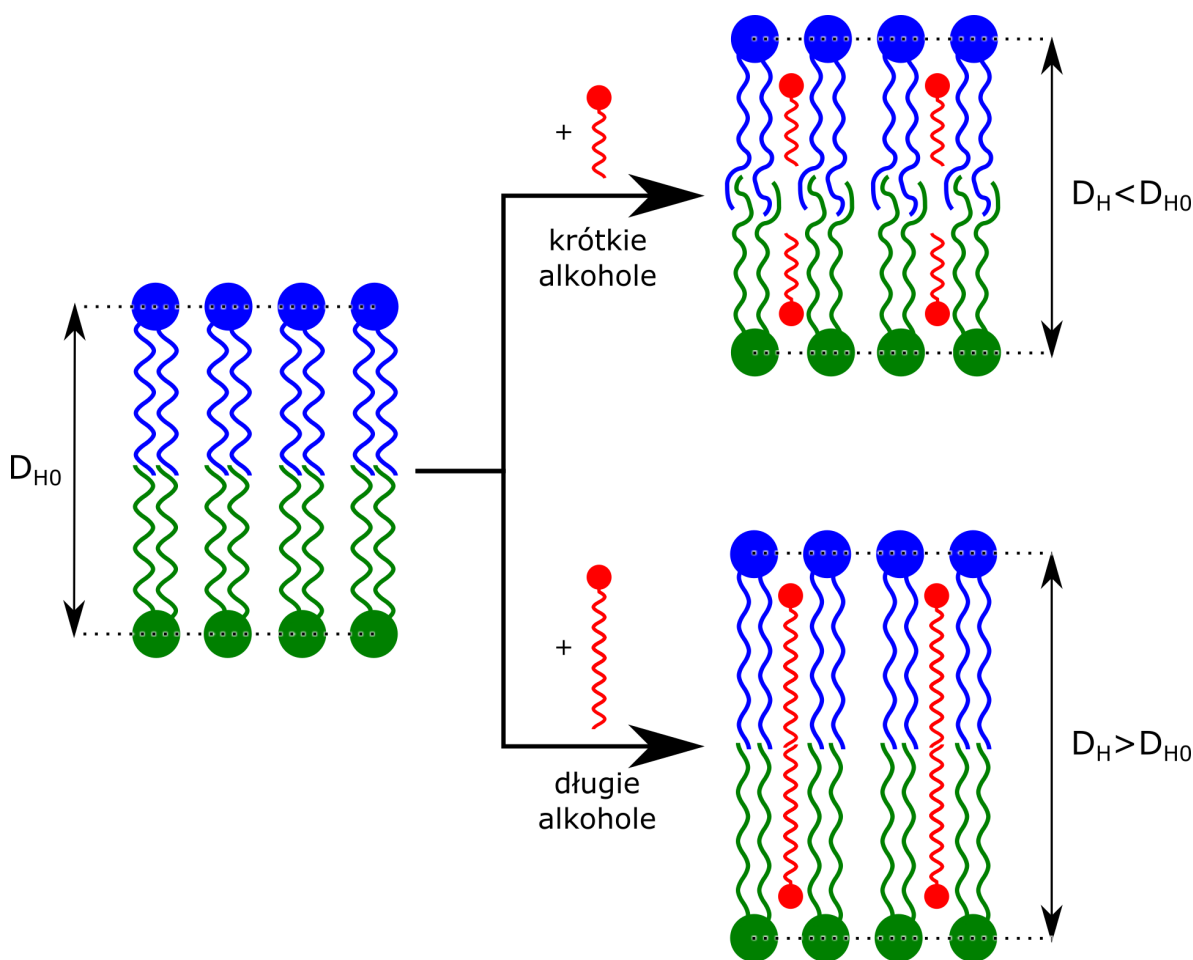
W przypadku błony domieszkowanej C10 bądź C12 możemy zauważyć zmniejszone nakładanie warstw lipidowych (odpowiednio o 7% i 44%) w stosunku do czystego DMPC. Dodatkowo, obserwujemy znaczące nakładanie się profili gęstości alkoholowych atomów węgla. Sugeruje to zatem, że domieszkowanie błon alkoholami o dłuższych łańcuchach w znaczący sposób zwiększa uporządkowanie lipidów, przyczyniając się do wzrostu grubości błony.

Podsumowując, potwierdziłem, że domieszkowanie błony DMPC krótkimi alkoholami (C6) prowadzi do zmniejszenia jej grubości oraz obniżenia temperatury przejścia fazowego ( $T_m$ ). Przeciwnie, domieszkowanie błony alkoholami C8, C10 i C12 powoduje zwiększenie grubości błony oraz podwyższenie  $T_m$ , przy czym wzrosty te są większe dla alkoholi o dłuższych łańcuchach węglowych.

Analiza współczynników  $S_{CD}$  lipidów ukazała ogólne zwiększenie uporządkowania konformacyjnego lipidów w wyniku domieszkowania alkoholami. Jednakże, w przypadku błony z dodatkiem heksanolu (C6) zaobserwowałem spadek uporządkowania terminalnych fragmentów łańcuchów acylowych.

Aby wyjaśnić, dlaczego domieszkowanie błony krótkimi alkoholami powoduje spadek uporządkowania terminalnych fragmentów acylowych, podczas gdy dla dłuższych alkoholi obserwuje się wyłącznie zwiększone uporządkowanie, przeanalizowałem nakładanie się terminalnych atomów węgla lipidów między warstwami błonowymi. Zgodnie z oczekiwaniami, największe nakładanie się lipidów obserwujemy w błonie domieszkowanej C6, podczas gdy najmniejsze nakładanie się lipidów obserwujemy w błonie domieszkowanej dodekanolem (C12).

Zmiany w stopniu nakładania się łańcuchów acylowych między warstwami błonowymi można wyjaśnić w kontekście niedopasowania hydrofobowego między długością hydrofobowego segmentu alkoholu a długością hydrofobowej części lipidu. Jak przedstawiłem na Rys. 4.43, obecność alkoholi o krótkim łańcuchu wywołuje istotne niedopasowanie, które



**Rys. 4.43:** Schematyczna reprezentacja odpowiedzi układu na niedopasowanie hydrofobowe wynikające z różnicy długości między łańcuchem alkilowym alkoholu i łańcuchem acylowym lipidu. Dodanie krótkich alkoholi prowadzi do powstania pustych przestrzeni, co jest niekorzystne energetycznie. Dlatego dochodzi do ich wypełnienia przez łańcuchy acylowe lipidów, co wymaga obniżenia uporządkowania końcowych fragmentów acylowych, co w rezultacie zmniejsza grubość błony. Natomiast dodatek długich alkoholi wyłącznie zwiększa uporządkowanie lipidów, co skutkuje zwiększeniem grubości błony.

skutkuje powstaniem niekorzystnych energetycznie pustych przestrzeni w centralnej części błony. W rezultacie te przestrzenie są wypełniane przez łańcuchy acylowe lipidów, co wymaga obniżenia ich uporządkowania konformacyjnego i prowadzi do spadku współczynnika  $S_{CD}$  terminalnych atomów węgla. W następstwie, obserwujemy częstsze nakładanie się lipidów między listkami, co prowadzi do zmniejszenia grubości błony i obniżenia  $T_m$ . Przeciwnie, alkohole o dłuższych łańcuchach mają długość stosunkowo zgodną z lipidami, co skutkuje znacznym wzrostem uporządkowania łańcuchów acylowych i zwiększeniem grubości błony.

Dodatkowo, w przypadku błon domieszkowanych długołańcuchowymi alkoholami, termodynamicznie korzystniejsze staje się przejście z fazy ciekłej do fazy żelowej, co prowadzi do podwyższenia temperatury przejścia fazowego  $T_m$ . Ten efekt wynika ze zwiększenia długości łańcucha węglowego alkoholu, co prowadzi do wzrostu powierzchni kontaktu między łańcuchami acylowymi lipidów a łańcuchem alkilowym alkoholu. W rezultacie pomiędzy łańcuchami występują silniejsze oddziaływania przyciągające, co sprawia, że do

przejście fazowe, które wymaga zerwania tych oddziaływań, niezbędna jest wyższa temperatura.

#### 4.5.3 Reorientacja karotenoidów w błonie

Jak wspominałem w podrozdziale 1.4, jednym z możliwych sposobów minimalizacji zaburzeń błony wynikających z niedopasowania hydrofobowego jest zmiana orientacji cząsteczki w błonie. Jak to zostało szczegółowo omówione w części poświęconej modelowym inkluzjom, w przypadku dodatniego niedopasowania hydrofobowego inkluzje mają tendencje do przechylania się, dostosowując swoją efektywną długość hydrofobową (wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni błony) do grubości rdzenia hydrofobowego błony. Z kolei w przypadku ujemnego niedopasowania, inkluzje mogą zmieniać swoją orientację z wertykalnej (prostopadłej do powierzchni błony) na horyzontalną (równoległą do powierzchni błony), sytuując się wówczas zwykle na powierzchni błony).

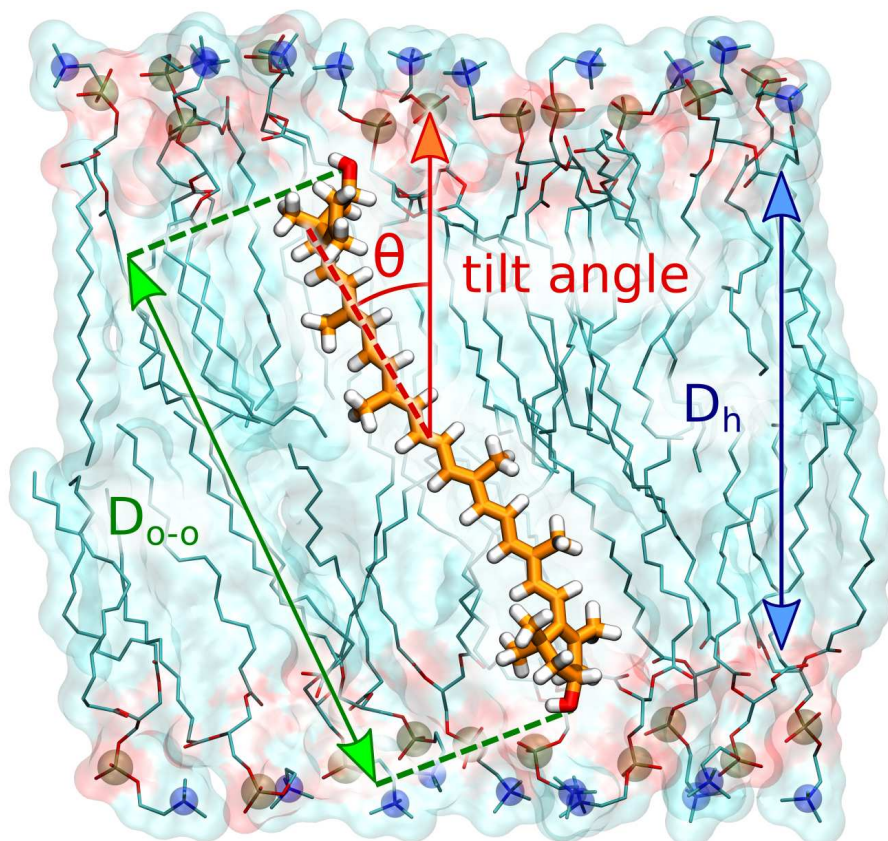
Zespół prof. Gruszeckiego (UMCS w Lublinie) prowadzi badania nad rolą karotenoidów siatkówki oka ludzkiego (luteiny, zeaksantyny i meso-zeaksantyny) w procesie widzenia. Wykorzystując techniki spektroskopowe i mikroskopowe oparte na czasie życia fluorescencji i rozpraszaniu Ramana, badacze zaobserwowali, że wzrost intensywności światła padającego na błonę zawierającą karotenoidy, takie jak zeaksantyna i luteina, prowadzi do zwiększenia pochłaniania światła w zakresie widma absorpcji karotenoidów. Obserwacje te poczynione początkowo przy okazji badań nad błonami modelowymi (liposomami) zostały następnie potwierdzone z wykorzystaniem siatkówek wypreparowanych z ludzkiego oka. Wykazano ponadto, że zjawisku zwiększonej absorpcji światła towarzyszyła fotoizomeryzacja karotenoidów z formy all-trans do jednej z form cis, z których najczęściej występującymi były formy 9- i 13-cis. Badacze zaobserwowali także, że przy niskim natężeniu światła, dominującą formę Zea stanowi izomer all-trans, podczas gdy wysokie natężenie światła sprzyja pojawianiu się frakcji izomerów cis.

Postawiono w związku z tym hipotezę, zgodnie z którą fotoizomeryzacja mogłaby prowadzić do reorientacji karotenoidów w błonie, co z kolei skutkowałoby obrotem ich dipolowych momentów przejścia w kierunku orientacji horyzontalnej, zwiększając absorpcję światła padającego prostopadle na błonę fotoreceptorów.

Aby zweryfikować tę hipotezę, skoncentrowałem się na zbadaniu preferowanej orientacji izomerów karotenoidów siatkówki w zależności od ich konformacji cis-trans. W tym celu przeprowadziłem obliczenia zmian energii swobodnej towarzyszących zmianie orientacji cząsteczki Zeaksantyny (Zea) w błonie, stosując jako współrzedną reakcji kąt między długą osią cząsteczki a osią prostopadłą do powierzchni błony (kąt  $\vartheta$  na Rys. 4.44). Ponieważ oba pierścienie w cząsteczce luteiny mają nieco inną strukturę (patrz: Rys. 1.5), cząsteczka luteiny posiada więcej izomerów niż zeaksantyna. Dlatego do analizy została wybrana symetryczna cząsteczka zeaksantyny. Warto jednak zaznaczyć, że ogólne wnioski, które

uzyskałem, nie powinny zależeć od subtelnych różnic strukturalnych pomiędzy poszczególnymi karotenoidami.

Do zbadania preferowanej orientacji izomerów zeaksantyny wykorzystałem dwa rodzaje błon: i) dwuwarstwę DPPC (di-16:0 PC), którego skład odpowiadał liposomom używanym w eksperymentach *in vitro*, oraz ii) modelową błonę o składzie odpowiadającym błonom komórkowym neuronów siatkówki oka, zawierającą wielonienasycone fosfolipidy: SDPC (18:0-22:6 PC), SDPE (18:0-22:6 PE) i SDPS (18:0-22:6 PS) [177].



**Rys. 4.44:** Reprezentatywna struktura błony DPPC zawierającej zeaksantynę w konformacji all-trans otrzymana w symulacji dynamiki molekularnej. Długość cząsteczki karotenoidu oznaczona jest jako  $D_{o-o}$ , zaś grubość rdzenia hydrofobowego błony jako  $D_h$ . Kąt między łańcuchem polienowym karotenoidu a osią prostopadłą do powierzchni błony oznaczony jest jako  $\theta$ .

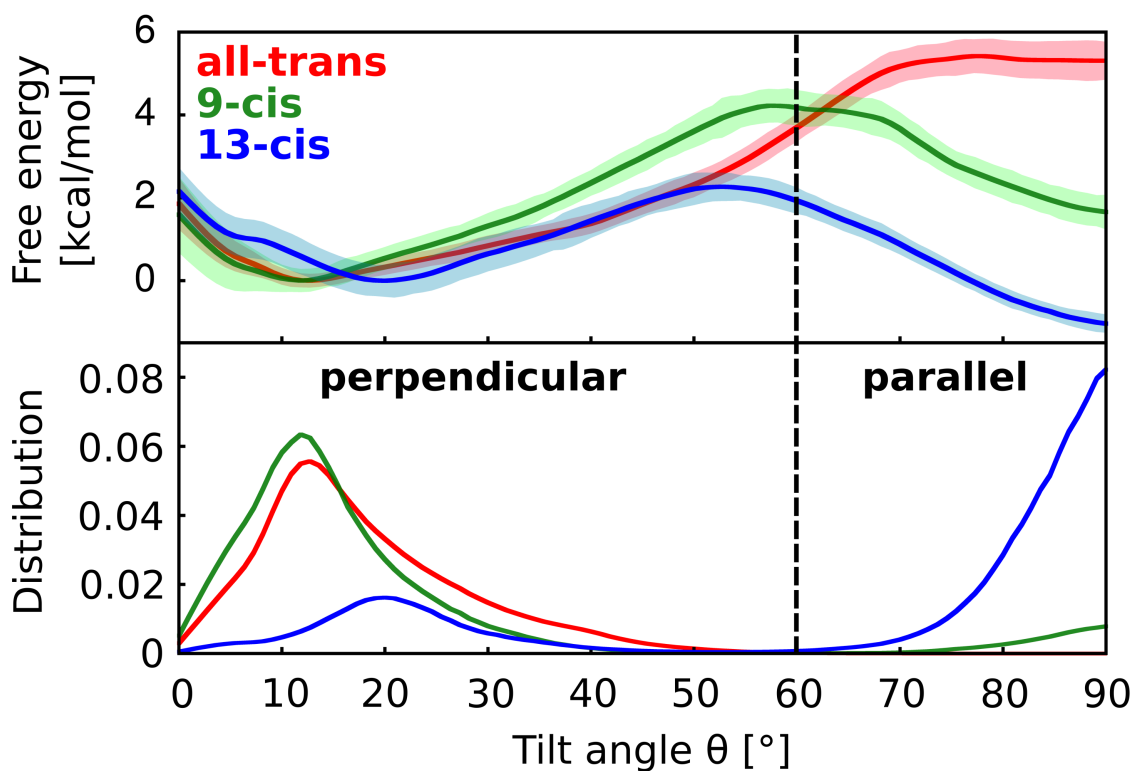
Na Rys. 4.45 widzimy, że w przypadku izomeru all-trans istnieje jedno minimum energetyczne odpowiadające orientacji prostopadłej do powierzchni błony, a jego głębokość wynosi około 5 kcal/mol. Oznacza to, że izomer all-trans przyjmuje niemal wyłącznie orientację prostopadłą ( $\sim 99.98\%$ ).

Dla izomeru 9-cis zaobserwowałem obecność dwóch minimum energetycznych, z czego głębokość minimum odpowiadającego orientacji prostopadłej była o około 2 kcal/mol większa niż dla orientacji horyzontalnej (Rys. 4.45). Wynik ten wskazuje, że około 20% cząsteczek Zea w formie 9-cis przyjmuje w błonie orientację horyzontalną.



W przypadku izomeru 13-cis także zaobserwowałem obecność dwóch minimów energetycznych, jednak tym razem głębokość minimum odpowiadającego orientacji horyzontalnej była o około 1 kcal/mol większa niż dla orientacji prostopadłej (Rys. 4.45). Oznacza to, że około 80% cząsteczek Zea w formie 13-cis przyjmuje w błonie orientację horyzontalną.

Uzyskane wyniki wskazują, że izomeryzacja Zea all-trans do form zarówno 9-cis, jak i 13-cis, sprzyja pojawieniu się frakcji cząsteczek usytuowanych równoległe do powierzchni błony. Potwierdza to hipotezę postawioną na podstawie badań spektroskopowych, zgodnie z którą zwiększenie natężenia światła padającego na błonę zawierającą karotenoidy sprzyja fotoizomeryzacji z formy all-trans do form cis, jednocześnie prowadząc do wzrostu frakcji cząsteczek zorientowanych równoległe do powierzchni.



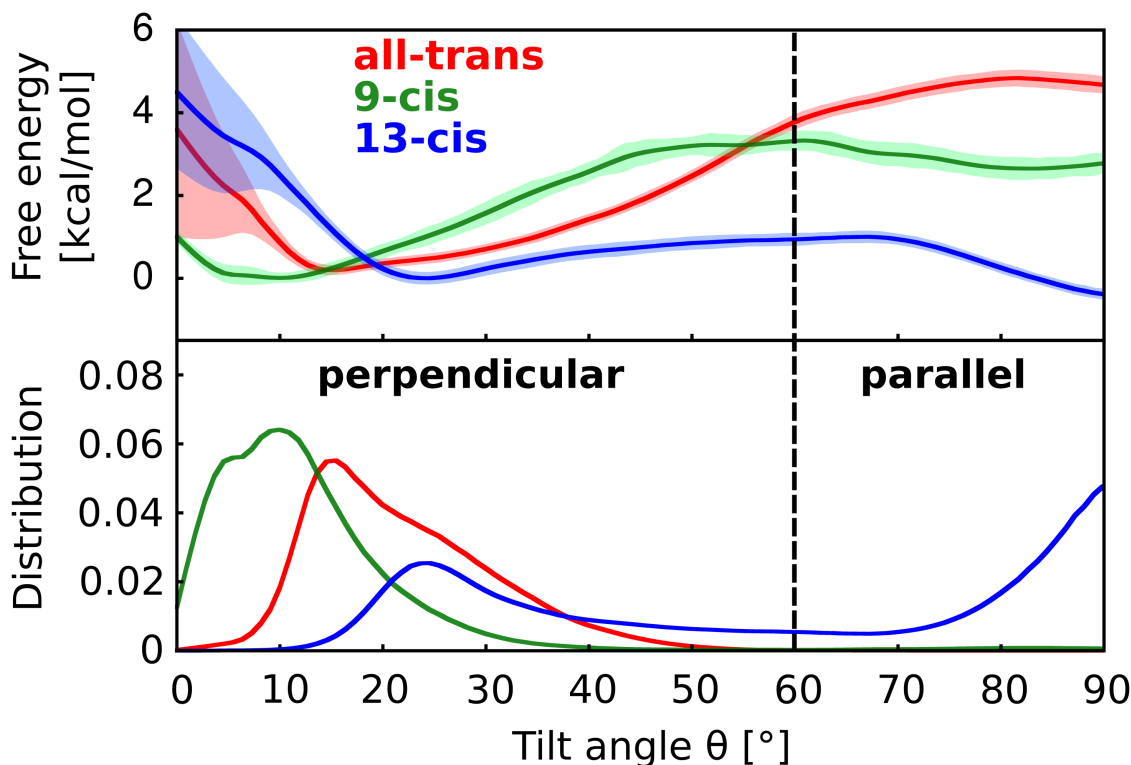
Rys. 4.45: Zmiany energii swobodnej towarzyszące reorientacji cząsteczek izomerów zeaksantyny w błonie DPPC (góra) oraz korespondujące z nimi profile gęstości prawdopodobieństwa zorientowania cząsteczek pod kątem  $\theta$  (dół).

W analogiczny sposób zbadałem również energetykę reorientacji izomerów Zea w błonie o składzie odpowiadającym błonie neuronów siatkówki oka. Z Rys. 4.46 widać, że dla formy all-trans, podobnie jak w przypadku błony DPPC, brak jest minimum energetycznego odpowiadającego orientacji horyzontalnej. Natomiast głębokość minimum obserwowanego na Rys. 4.46 wskazuje, że Zea w formie all-trans przyjmuje orientację niemal wyłącznie prostopadłą ( $\sim 99.82\%$ ).

W przypadku izomerów 9-cis oraz 13-cis obserwujemy dwa minima, wskazujące na obecność cząsteczek zarówno w orientacji równoległej, jak i prostopadłej do powierzchni



blony. Konkretnie frakcja cząsteczek izomeru 9-cis w orientacji horyzontalnej wynosi w tym przypadku około 2%, podczas gdy dla izomeru 13-cis jest on równa ok. 45%.

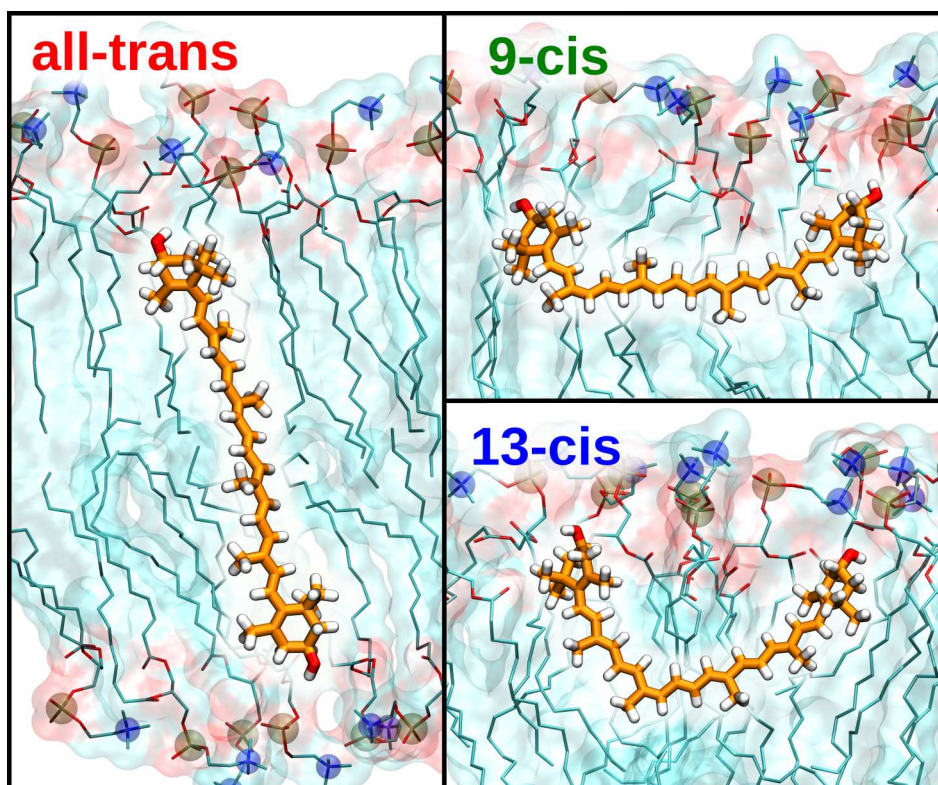


Rys. 4.46: Zmiany energii swobodnej towarzyszące reorientacji cząsteczek izomerów zeaksantyny w błonie o składzie odpowiadającym błonom komórkowym neuronów siatkówki oka (góra) oraz korespondujące z nimi profile gęstości prawdopodobieństwa zorientowania cząsteczek pod kątem  $\theta$  (dół).

Zadałem sobie następnie pytanie, czy wzrost frakcji izomerów Zea w orientacji horyzontalnej można uzależnić od wielkości niedopasowania hydrofobowego  $\Delta D$ . W tym celu oszacowałem długość każdego z izomerów Zea ( $D_{O-O}$ ), którą zdefiniowałem jako odległość między grupami hydroksylowymi Zea (patrz: Rys. 4.44). Następnie od tych wartości odjąłem  $D_h$ , reprezentującą grubość niezaburzonej błony DPPC, która wynosiła 3.1 nm.

W przypadku izomeru all-trans uzyskałem wartość  $\Delta D = -0.2$  nm, co oznacza, że długość cząsteczki jest nieznacznie mniejsza od grubości rdzenia hydrofobowego. Jak ukazałem na Rys. 4.47, izomer all-trans jest wystarczająco długi, aby z łatwością przyjmować orientację transbłonową, nie zaburzając jednocześnie w znaczący sposób lipidów w jego bliskim sąsiedztwie i oddziałując za pośrednictwem swoich grup -OH z obiema powierzchniami błony.

Dla izomeru 9-cis uzyskałem  $\Delta D = -0.6$  nm, co wskazuje na znacznie silniejsze niedopasowanie hydrofobowe w porównaniu do izomeru all-trans. Tłumaczy to obecność frakcji około 20% cząsteczek Zea cząsteczek w orientacji horyzontalnej, która minimalizuje zaburzenie wynikające z niedopasowania hydrofobowego. Z kolei dla izomeru 13-cis, uzyskałem  $\Delta D = -1.0$  nm, co oznacza jeszcze silniejsze ujemne niedopasowanie hydrofobowe. Z tego powodu izomer 13-cis, ze względu na swoją zmniejszoną efektywną długość,



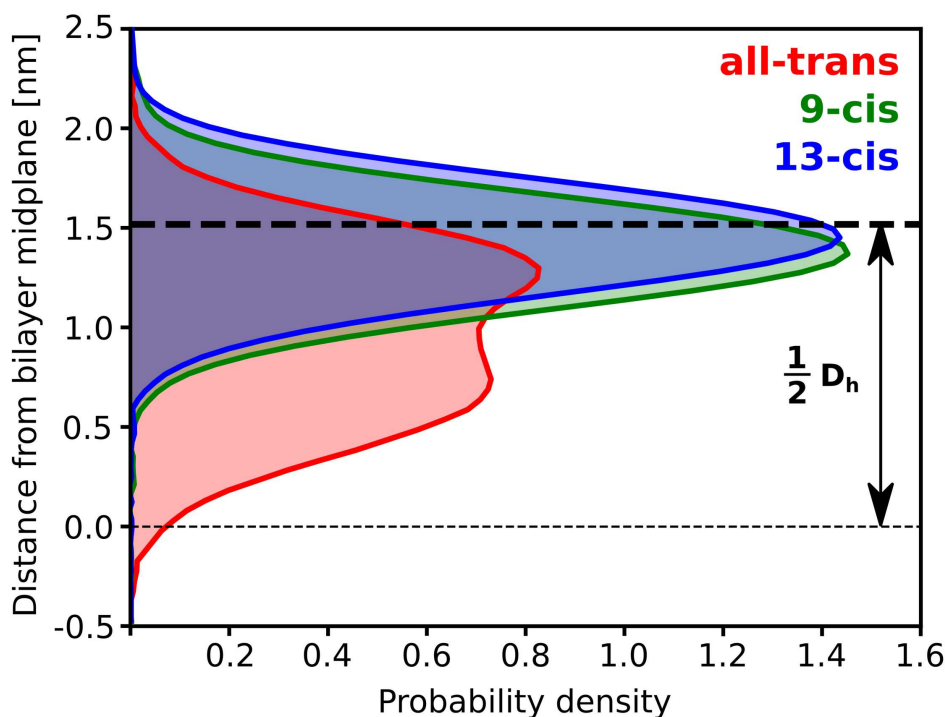
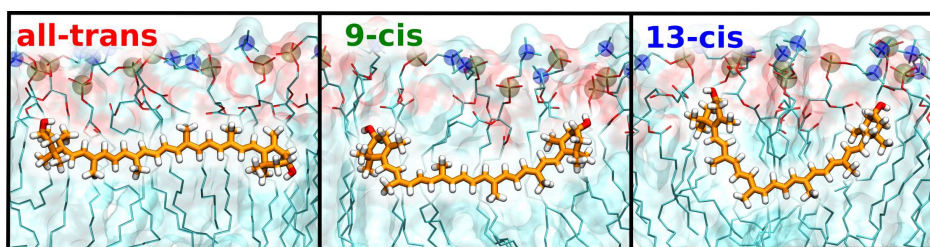
Rys. 4.47: Reprezentatywne klatki z symulacji dynamiki molekularnej przedstawiające zeaksantynę w orientacjach dominujących dla poszczególnych izomerów w błonie DPPC.

nie mógłby korzystanie oddziaływać z oboma rejonami polarnymi błony, co skutkowałoby znaczącym zaburzeniem lipidów znajdujących się w jego bezpośrednim otoczeniu. Dlatego dominująca frakcja cząsteczek w formie 13-cis (80%) jest usytuowana w orientacji horyzontalnej (patrz: Rys. 4.47).

Biorąc pod uwagę strukturę chemiczną cząsteczek Zea w formie all-trans, można by zakładać, że powinny one stosunkowo łatwo przybierać orientację horyzontalną w błonie. W takim ułożeniu obie grupy hydroksylowe mogłyby oddziaływać z rejonem polarnym błony z tej samej strony, a dzięki liniowej budowie i małej “średnicy” cząsteczki Zea zaburzenie sąsiadujących cząsteczek lipidów byłoby nieznaczne. Niemniej jednak, jak pokazałem na Rys. 4.45, izomer all-trans Zea przyjmuje orientację horyzontalną bardzo niechętnie. W celu zidentyfikowania przyczyny trudności w zmianie orientacji z prostopadłej na horyzontalną, wyznaczyłem rozkłady grup hydroksylowych wzdłuż osi normalnej do powierzchni dla trzech rozważanych izomerów Zea w orientacji horyzontalnej.

Na Rys. 4.48 widzimy, że dla izomeru all-trans rozkład gęstości ma charakter dwumodalny, w przeciwieństwie do izomerów 9- i 13-cis. Sugeruje to, że każda z grup hydroksylowych Zea w formie all-trans usytuowana jest w innej odległości od środka błony. Jedna z grup hydroksylowych znajduje się w odległości około 1.2 nm od środka błony, podczas gdy druga z nich znajduje się w odległości około 0.7 nm. Oznacza to, że cząsteczka Zea w formie all-trans posiada grupy hydroksylowe skierowane w przeciwnych kierunkach





Rys. 4.48: Prawdopodobieństwo znalezienia grup hydroksylowych Zea w różnych odległościach od środka błony, pokazane osobno dla każdego z badanych izomerów w orientacji horyzontalnej (panele powyżej).

– odpowiednio w kierunku powierzchni i w kierunku środka błony (Rys. 4.48). W świetle tego, w przypadku horyzontalnie zorientowanej cząsteczki all-trans Zea tylko jedna grupa hydroksylowa uczestniczy w tworzeniu korzystnego wiązania wodorowego z polarnym rejonem błony. Natomiast w orientacji prostopadłej obie grupy hydroksylowe mogą tworzyć takie wiązania z przeciwnymi rejonami polarnymi. To wyjaśnia, dlaczego jedynie znikoma frakcja cząsteczek Zea w formie all-trans przyjmuje orientację horyzontalną.

Przeciwnie, dla izomerów 9- i 13-cis obserwujemy jedno, wyraźne maksimum w odległości około 1.4 nm od środka błony. Oznacza to, że obie grupy hydroksylowe są zorientowane w kierunku polarnej powierzchni błony, co jest korzystne energetycznie. Wyjaśnia to, dlaczego zmiana orientacji izomerów cis z prostopadłej do horyzontalnej, napędzana przez niedopasowanie hydrofobowe, zachodzi bez przeszkód, w przeciwieństwie do reorientacji izomeru all-trans.

Jak pokazałem, izomery Zea wykazujące ujemne niedopasowanie hydrofobowe reorientują w błonie, przyjmując ułożenie horyzontalne. Co ciekawe, dla modelowych inkluzji

reprezentujących helisy transbłonowe nie zaobserwowałem takiej odpowiedzi na niedopasowanie hydrofobowe. Sugeruje to, że sposób odpowiedzi inkluzji błonowych na niedopasowanie może wynikać także z takich czynników jak efektywna średnica cząsteczki. Jeśli jest ona zbyt duża, reorientacja do ułożenia horyzontalnego mogłaby spowodować zaburzenie błony, którego koszt energetyczny jest większy niż ten wynikający z niedopasowania w orientacji wertykalnej.

Podsumowując, zintegrowane podejście badawcze, łączące spektroskopię i symulacje komputerowe, umożliwiło zaproponowanie szczegółowego mechanizmu fotoprotekcyjnego karotenoidów w siatkówce ludzkiego oka. Nadmierna ekspozycja oka na promieniowanie świetlne może prowadzić do uszkodzenia fotoreceptorów wskutek ich utleniania przez reaktywne formy tlenu. Aby ograniczyć nadmierny wpływ promieniowania świetlnego na narząd wzroku, uruchamiana jest reakcja zwrotna polegająca na zwężeniu źrenicy oka. Jednakże, źrenica ma ograniczone możliwości odpowiedzi na światło, kurcząc się do rozmiarów nie mniejszych niż 2 mm [193]. Dlatego pewien obszar siatkówki, znany jako plamka żółta, jest trwale narażony na działanie światła. Stąd zaproponowaliśmy, że w plamce żółtej, gdzie stężenie karotenoidów jest najwyższe [102], działa dodatkowy mechanizm ochronny dla znajdujących się tam fotoreceptorów.

W warunkach niskiego natężenia światła, cząsteczki karotenoidów, które znajdują się w zewnętrznych warstwach siatkówki oka, przyjmują orientację prostopadłą do powierzchni błony, będąc w formie all-trans. Dzięki temu możliwe jest przenikanie światła do głębszych warstw siatkówki zawierających fotoreceptory. W przypadku zwiększonej intensywności padającego światła, cząsteczki karotenoidów ulegają fotoizomeryzacji do formy cis, co skutkuje ich horyzontalnym ułożeniem w błonie. To z kolei ogranicza przenikanie światła do kolejnych warstw siatkówki. Badania potwierdzają [106], że reakcja karotenoidów na zwiększoną ekspozycję światła jest szybsza niż reakcja źrenicy na to samo promieniowanie świetlne. Proponowany tutaj mechanizm fotoprotekcyjny karotenoidów można zatem porównać do działania żaluzji, które osłaniają fotoreceptory w oku.

#### 4.5.4 Podsumowanie

W tej części pracy zajmowałem się badaniem rzeczywistych układów o znaczeniu biologicznym, w których niedopasowanie hydrofobowe odgrywa istotną rolę jako dominująca siła napędowa. Skupiłem się na roli niedopasowania hydrofobowego w wiązaniu cholesterolu do prostych peptydów L11 i KALP21, asocjacji peptydu APP z miejscem katalitycznym białka  $\gamma$ -sekretazy, oraz oligomeryzacji koniugatów TP10–NH<sub>2</sub>–LVX. Dodatkowo, zbadałem wpływ niedopasowania hydrofobowego na zmianę właściwości fizykochemicznych błony pod wpływem ich domieszkowania alkoholami o różnej długości hydrofobowej oraz na reorientację karotenoidów w błonie.

Porównując peptydy L11 i KALP21 pokazałem, że tworząc warunki ujemnego niedopasowania hydrofobowego, można uzyskać efekt specyficznego wiązania cholesterolu.



terolu z peptydami transbłonowymi. Im bardziej ujemne niedopasowanie hydrofobowe. Wprowadzenie do błony peptydu transbłonowego prowadzi do tym większego ścinienia błony, im bardziej ujemne jest niedopasowanie hydrofobowe pomiędzy peptydem a rdzeniem błony. Ze względu na swoją mniejszą efektywną długość hydrofobową cholesterol wykazuje tendencję do lokalizowania się w takich obszarach ścinienia błony. Stąd, specyficzne wiązanie cholesterolu przez peptyd jest korzystną energetycznie odpowiedzią na niedopasowanie hydrofobowe. Moje obliczenia pokazały także, że ta specyficzność może być dodatkowo zwiększona przez zastosowanie polarnej reszty, takiej jak lizyna. Co ciekawe, obserwowana asocjacja nie wymaga obecności specyficznego motywu wiążącego, zawierającego aromatyczny aminokwas, jak sugerowała wcześniejsza literatura.

Badania nad wiązaniem peptydu APP do  $\gamma$ -sekreazy wykazały istotną rolę cholesterolu w tym procesie, potencjalnie tłumacząc od dawna znaną zależność między hipercholesterolemią a chorobą Alzheimera. Obecność cholesterolu w błonie powoduje zwiększenie jej grubości. W konsekwencji obserwujemy ujemne niedopasowanie hydrofobowe zarówno w otoczeniu APP, jak i miejsca katalitycznego  $\gamma$ -sekreazy. W odpowiedzi na to, dążąc do minimalizacji niekorzystnego efektu, układ preferuje asocjację APP z  $\gamma$ -sekreazą. Rzeczywiście, ilościowa analiza z wykorzystaniem teorii napięcia liniowego pokazała, że niedopasowanie hydrofobowe stanowi dominującą siłę napędową prowadzącą do wiązania APP z  $\gamma$ -sekreazą. Wiązanie to zatem nie wymaga specyficznych oddziaływań pomiędzy białkami lub pomiędzy nimi a cholesterolem. Konsystentnie, usunięcie cholesterolu z błony znacząco hamuje wiązanie się APP z  $\gamma$ -sekreazą, ponieważ prowadzi ono do znacznego wyeliminowania niedopasowania hydrofobowego w otoczeniu centrum aktywnego  $\gamma$ -sekreazy.

Symulacje zrealizowane w tej części pracy pozwoliły mi także na ustalenie, że koniugat TP10-NH<sub>2</sub>-LVX wykazuje silne powinowactwo do błony komórkowej, w której przyjmuje orientację horyzontalną. Ponadto pokazałem, że oligomeryzacja koniugatów jest niezbędna do utworzenia stabilnych kanałów perforujących błonę. Moje wyniki sugerują, że agregacji koniugatów sprzyja dodatnie niedopasowanie hydrofobowe między długością fragmentu peptydowego koniugatu a grubością błony. Ustaliłem również, że ich stabilność nie zależy od lipidowego składu błony. W związku z tym, możemy przypuszczać, że selektywność działania koniugatu wobec komórek nowotworowych musi wynikać z innych różnic między błonami komórek nowotworowych i zdrowych.

Na podstawie badań nad błonami zawierającymi alkohole o różnej długości łańcucha alkilowego wykazałem, że dodatek krótkich alkoholi prowadzi do powstawania pustych przestrzeni wewnątrz błony na skutek ujemnego niedopasowania hydrofobowego. W celu minimalizacji tego niekorzystnego efektu, dochodzi do zwiększonego nakładania się ogonów acylowych między dwoma warstwami błony. W konsekwencji, obserwujemy zmniejszenie uporządkowania terminalnych fragmentów łańcuchów acylowych. To z kolei prowadzi do zmniejszenia grubości błony i obniżenia temperatury przejścia fazowego. W przypadku długich alkoholi, obserwuje się przede wszystkim zwiększone uporządkowanie lipidów, co

prowadzi do zwiększenia grubości błony i podwyższenia temperatury przejścia fazowego. Wzrost ten jest tym bardziej wyraźny, im dłuższy jest łańcuch węglowy dodawanego alkoholu.

Ujemne niedopasowanie hydrofobowe może także sprzyjać reorientacji inkluzji w obrębie błony. Przykładem takiej odpowiedzi są zmiany orientacji karotenoidu zeaksantyny pod wpływem jej fotoizomeryzacji. Pokazałem, że izomer all-trans, którego długość molekularna jest zbliżona do grubości rdzenia hydrofobowego błony, przyjmuje w błonie wyłącznie orientację prostopadłą do powierzchni. Taka preferencja jest dodatkowo wzmacniana przez niekorzystne zorientowanie grup hydroksylowych Zea w ułożeniu równoległym. Z kolei izomery 9- i 13-cis, o znacznie mniejszej długości niż grubość błony, chętnie przyjmują orientację równoległą, która jest dodatkowo stabilizowana przez korzystne oddziaływanie obu grup hydroksylowych z polarną powierzchnią błony. W połączeniu z badaniami doświadczalnymi wyniki te pozwoliły na wysunięcie hipotezy dotyczącej udziału karotenoidów w fotoprotekcji oka. W przypadku niskiego natężenia światła, karotenoidy znajdujące się głównie w formie all-trans, ustawione są prostopadle do powierzchni błony, umożliwiając większej ilości światła przeniknięcie do głębszych warstw siatkówki, zawierających fotoreceptory. Z kolei zwiększone natężenie światła przyczynia się do fotoizomeryzacji karotenoidów do jednej z form cis, która przyjmuje horyzontalną orientację w błonie, ograniczając tym samym przenikanie światła przez nią. Dzięki temu fotoreceptory w oku chronione są przed nadmiernym naświetleniem i potencjalnym trwałym uszkodzeniem ich struktury.



### Wnioski

W niniejszej rozprawie doktorskiej zajmowałem się wieloaspektową analizą niedopasowania hydrofobowego i jego roli w procesach zachodzących w obrębie błon lipidowych. Głównym celem było szczegółowe zrozumienie niedopasowania hydrofobowego jako jednej z kluczowych sił napędowych w procesach asocjacji inkluzji błonowych oraz ich segregacja pomiędzy domenami błonowymi o różnym stopniu uporządkowania konformacyjnego. Ponadto zajmowałem się wpływem niedopasowania hydrofobowego na preferowane ułożenie inkluzji w błonie oraz na właściwości fizykochemiczne samej dwuwarstwy lipidowej.

Dotychczasowe badania nad rolą niedopasowania hydrofobowego koncentrowały się głównie na peptydach transbłonowych, co wprowadza dodatkowy czynnik związany z wpływem specyficznej budowy chemicznej inkluzji na badany proces. W związku z tym, w ramach swojej pracy skonstruowałem minimalny model inkluzji transbłonowej, którego zadaniem było odzwierciedlenie zachowania takich inkluzji jak helisy transbłonowe, przy jednoczesnym wyeliminowaniu specyficznych oddziaływań między inkluzją a resztą układu.

Wykorzystując ten model w symulacjach dynamiki molekularnej, przeprowadziłem następnie molekularną charakterystykę niedopasowania hydrofobowego, uzyskując w ramach czterech podjętych zadań badawczych następujące wnioski:

#### 1. Zbadanie energetyki procesu tworzenia ujemnego niedopasowania hydrofobowego.

W ramach tego zadania przeprowadziłem analizę kosztu energetycznego związanego z umieszczeniem w błonie inkluzji charakteryzującej się ujemnym niedopasowaniem hydrofobowym.

Otrzymane wyniki wskazują, że główna siła przeciwdziałająca powstawaniu ujemnego niedopasowania hydrofobowego związana jest ze zwiększeniem liczby niekorzystnych kontaktów pomiędzy zaburzonymi lipidami w lokalnym otoczeniu inkluzji a cząsteczkami wody. Ten silnie niekorzystny wkład do zmiany energii swobodnej związanej z powstawaniem niedopasowania jest częściowo skompensowany przez przyciągające oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy inkluzją a cząsteczkami lipidów. Wzmocnienie tych oddziaływań pod wpływem utworzenia niedopasowania wynika ze zbliżenia się grup fosforanowych lipidów do dodatnio naładowanych końców modelowej inkluzji reprezentujących dodatnio naładowane reszty aminokwasowe kotwiczące helisy transbłonowe na powierzchni błony. Można zatem zaproponować, że w odpowiedzi na pojawienie się ujemnego niedopasowania układ dąży do minimalizacji kontaktów między wodą a błoną, czemu towarzyszy także zwiększenie udziału korzystnych oddziaływań między inkluzją a grupami fosforanowymi lipidów.

## 2. Określenie roli niedopasowania hydrofobowego w asocjacji inkluzji błonowych.

Jedną z odpowiedzi na niedopasowanie hydrofobowe jest asocjacja inkluzji. Wykorzystując opracowany model zbadalem wpływ niedopasowania hydrofobowego na energetykę tworzenia oraz stabilność dimerów inkluzji. Obliczone przeze mnie zmiany energii swobodnej towarzyszące dimeryzacji wskazują, że dimery są tym bardziej stabilne, im bardziej ujemne jest niedopasowanie hydrofobowe. Ponadto, stabilność takich dimerów jest znacznie wyższa w błonach uporządkowanych niż w nieuporządkowanych. Z kolei dodatnie niedopasowanie hydrofobowe stabilizuje dimery znacznie słabiej w porównaniu do niedopasowania ujemnego.

Ustaliłem, że spadek liczby kontaktów między wodą a błoną, wywołany procesem dimeryzacji, jest tym bardziej znaczący, im większe jest ujemne niedopasowanie hydrofobowe. Moje wyniki wskazują, że jest to główna molekularna przyczyna wzrostu stabilności dimerów wraz z rosnącym niedopasowaniem hydrofobowym. Wniosek ten potwierdzają korzystne dominujące wkłady do energii swobodnej dimeryzacji związane z oddziaływaniami elektrostatycznymi.

Pokazałem również, że w błonach o wysokim uporządkowaniu lipidów dimeryzacji inkluzji towarzyszy większy spadek liczby kontaktów między wodą a błoną w porównaniu do błon o małym uporządkowaniu. Z tego powodu w błonach o większym uporządkowaniu lipidów obserwujemy większą stabilność dimerów.

Wykorzystując teorię napięcia liniowego, wykazałem, że dalekozasięgowe siły sprzyjające dimeryzacji inkluzji wynikają z nakładania się na siebie obszarów błony zaburzonych przez te inkluzje. Zasięg tych sił jest proporcjonalny do wielkości ujemnego niedopasowania hydrofobowego, co potwierdzają szerokie zakresy niezerowego nachylenia profili energii swobodnej opisujących dimeryzację inkluzji w przypadku silnego ujemnego niedopasowania hydrofobowego.

Przeprowadzone przeze mnie symulacje sugerują także, że dodatnie niedopasowanie hydrofobowe stabilizuje stan dimeryczny inkluzji w znacznie mniejszym stopniu, ponieważ konkurencyjny proces polegający na przechylaniu się inkluzji w błonie stanowi bardziej korzystny energetycznie sposób minimalizacji tego rodzaju niedopasowania. Spójnie z tym wnioskiem wyeliminowanie możliwości przechylania się prowadzi w obecności dodatniego niedopasowania hydrofobowego do znacznego wzrostu stabilności dimerów. Obserwacja ta może być szczególnie istotna dla większych inkluzji, takich jak pełnoskalowe białka błonowe, w przypadku których nie jest możliwa istotna reorientacja [34].

## 3. Określenie roli niedopasowania hydrofobowego w segregacji inkluzji pomiędzy domenami błonowymi o różnym stopniu uporządkowania konformacyjnego.

Badając preferencję inkluzji do lokalizowania się w obrębie domen błonowych o różnym stopniu uporządkowania konformacyjnego, zaobserwowałem istotny wpływ niedopasowania hydrofobowego na współczynnik podziału między tymi domenami.

Konkretnie, analiza zmian energii swobodnej towarzyszących przeniesieniu inkluzji między domenami wykazała, że w przypadku braku niedopasowania hydrofobowego inkluzje preferowały lokalizację w domenie nieuporządkowanej, co było wcześniej obserwowane dla różnych biologicznie czynnych inkluzji [43–46]. Wykazałem dalej, że obecność ujemnego niedopasowania hydrofobowego wpływa na współczynnik podziału inkluzji, zmniejszając jej preferencję do lokalizowania się w domenie, do której jest hydrofobowo niedopasowana. Wpływ ten jest na tyle istotny, że przy dostatecznie dużym niedopasowaniu w domenie nieuporządkowanej inkluzje preferencyjnie lokalizują się w domenie uporządkowanej, odwracając zwykle obserwowany trend.

Wpływ niedopasowania hydrofobowego na segregację inkluzji ponownie związany jest z lokalnym zaburzeniem błony prowadzącym do powstawania niekorzystnych kontaktów między wodą a lipidami. Jak wcześniej wspomniałem, liczba kontaktów między wodą a błoną rośnie proporcjonalnie do wielkości ujemnego niedopasowania hydrofobowego. Inkluzje preferują zatem te domeny, gdzie ujemne niedopasowanie hydrofobowe jest mniejsze, minimalizując w ten sposób liczbę kontaktów woda-błona w otoczeniu inkluzji.

Zaobserwowałem także, że przy podobnym dodatnim niedopasowaniu hydrofobowym w domenie uporządkowanej i nieuporządkowanej inkluzja preferuje lokalizację w tej pierwszej. Preferencja ta wynika z wyższego upakowania lipidów w domenie uporządkowanej, które sprzyja tworzeniu korzystnych energetycznie kontaktów pomiędzy łańcuchami lipidów a inkluzją. Wniosek ten potwierdziła dekompozycja energii swobodnej przeniesienia, która wykazała dominującą rolę wkładu dyspersyjnego. Moje wyniki sugerują zatem, że segregacja inkluzji między domenami o różnym stopniu uporządkowania w odpowiedzi na ujemne i dodatnie niedopasowanie hydrofobowe ma różne podłoże molekularne.

Powyższe wnioski potwierdziłem z użyciem rzeczywistych inkluzji o znaczeniu biologicznym. W szczególności pokazałem, że możliwe jest zwiększenie preferencji inkluzji do nieuporządkowanej domeny błonowej poprzez zwiększenie polarności inkluzji. Dodatkowo, poprzez badanie peptydów o różnych resztach aminokwasowych, które odpowiadają za kotwiczenie peptydu do polarnej powierzchni błony, pokazałem, że powinowactwo do nieuporządkowanej domeny jest większe, gdy utworzenie korzystnych kontaktów z lipidami domeny uporządkowanej jest utrudnione.

#### **4. Weryfikacja wniosków płynących z badań nad modelowymi inkluzjami z wykorzystaniem rzeczywistych układów o znaczeniu biologicznym.**

W ramach ostatniego zadania badałem uniwersalność wniosków, jakie sformułowałem na podstawie wyników uzyskanych z wykorzystaniem modelowej inkluzji.

Ponieważ pokazałem, że niedopasowanie hydrofobowe może działać jako kluczowa siła napędowa dla asocjacji inkluzji błonowych, można założyć, że istnieje możliwość wykorzystania go do projektowania peptydów zdolnych do specyficznego wiązania wybranych cząsteczek w błonie. Rzeczywiście, badania przeprowadzone we współpracy z zespołem



prof. H.J. Risselady pokazały, że zaprojektowane peptydy błonowe wykazujące silne ujemne niedopasowanie hydrofobowe zdolne są do specyficznego wiązania cząsteczki cholesterolu. Przy użyciu atomistycznych symulacji pokazałem, że energia swobodna wiązania cholesterolu przez peptyd jest tym większa, im większe jest powodowane przez niego lokalne zaburzenie błony.

Wobec wykazanej kluczowej roli niedopasowania hydrofobowego w procesach asocjacji inkluzji można też przypuszczać, że może ono mieć znaczenie dla wielu procesów fizjologicznych mających miejsce w obrębie błon biologicznych. Rzeczywiście, badania nad wiązaniem białka prekursorowego amyloidu przez enzym  $\gamma$ -sekretazę pokazały, że wiązanie to zachodzi w odpowiedzi na ujemne niedopasowanie hydrofobowe, prowadząc do zmniejszenia obszaru zaburzenia błony [76]. Ten wynik może wyjaśnić na poziomie molekularnym związek między hipercholesterolemią a postępem choroby Alzheimera. Konkretniej, zwiększony poziom cholesterolu przyczynia się do pogrubienia błon komórkowych neuronów, w których obecna jest  $\gamma$ -sekretaza. W odpowiedzi na ujemne niedopasowanie hydrofobowe, enzym ten wiąże prekursor amyloidu  $\beta$ , którego produkt cięcia, gromadzący się w wysokich stężeniach w postaci płytek, odpowiada za uszkodzenie tkanki nerwowej.

Pokazałem, że dodatnie niedopasowanie hydrofobowe może także odpowiadać za asocjację i stabilizację kanałów tworzonych przez błonowo czynne peptydy. Badania przeprowadzone we współpracy z grupą prof. K. Rolki pokazały, że koniugaty peptydu TP10 z cząsteczką antybiotyku lewofloksacyny wykazują tendencję do oligomeryzacji w błonie, co prowadzi do perforacji błony poprzez utworzenie stabilnych kanałów wodnych [93].

Badania nad modelową inkluzją pokazały, że inkluzja może też reorientować pod wpływem niedopasowania hydrofobowego. Ten efekt okazał się kluczowy dla zaproponowanego przez nas mechanizmu fotoprotekcji receptorów siatkówki oka przez karotenoidy. Przeprowadzone przeze mnie symulacje pomogły w interpretacji pomiarów spektroskopowych przeprowadzonych przez zespół prof. W.I. Gruszeckiego. Pokazałem, że izomery cis, których długość hydrofobowa jest mniejsza niż grubość błony, są skłonne do zmiany orientacji w błonie z wertykalnej na horyzontalną, podczas gdy izomer all-trans, który jest hydrofobowo dopasowany, przyjmuje niemal wyłącznie orientację wertykalną. W warunkach niskiego natężenia światła, cząsteczki karotenoidu w błonie przyjmują orientację prostopadłą do powierzchni błony, będąc głównie w formie all-trans. W efekcie, zewnętrzne warstwy siatkówki oka znacznie efektywniej przepuszczają światło do warstw zawierających fotoreceptory. Wraz ze zwiększeniem natężenia światła, karotenoidy ulegają izomeryzacji do formy cis, co sprzyja ich zorientowaniu horyzontalnemu w błonie, co ogranicza ilość padającego światła na fotoreceptory.

Wykazałem wreszcie, że wpływ domieszkowania błon lipidowych na ich właściwości fizykochemiczne może być także wyjaśniony na gruncie modelu niedopasowania hydrofobowego. Współpraca z zespołem prof. V.A. Raghunathana umożliwiła potwierdzenie istotnej roli niedopasowania hydrofobowego pomiędzy długością łańcucha alkilowego do-

dawanego alkoholu a długością łańcucha acylowego lipidów. Wykazaliśmy mianowicie, że obecność ujemnego niedopasowania hydrofobowego powoduje zmniejszenie grubości błony i temperatury przejścia fazowego. Natomiast dodatek alkoholi o długościach łańcuchów dopasowanych hydrofobowo do lipidów sprzyja zwiększeniu grubości błony oraz podwyższeniu temperatury przejścia fazowego.

## Bibliografia

- [1] S Jonathan Singer et al. "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes: Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids." *Science* 175.4023 (1972), 720–731.
- [2] Florent Schmitt et al. "A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure". *Frontiers in cellular neuroscience* 8 (2014), 25.
- [3] Harvey Lodish et al. *Molecular cell biology*. Macmillan, 2008.
- [4] Gerrit van Meer et al. "Lipid map of the mammalian cell". *Journal of cell science* 124.1 (2011), 5–8.
- [5] JH Ipsen et al. "Relationships between lipid membrane area, hydrophobic thickness, and acyl-chain orientational order. The effects of cholesterol". *Biophysical journal* 57.3 (1990), 405–412.
- [6] D Bochicchio et al. "The membrane bending modulus in experiments and simulations: a puzzling picture". *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly* 23 (2016), 117–143.
- [7] Moghis U Ahmad et al. "Polar lipids: Phospholipids and glycolipids". *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2005), 1–27.
- [8] Anne SB Olsen et al. "Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases". *Open biology* 7.5 (2017), 170069.
- [9] Giuseppe Paradies et al. "Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1837.4 (2014), 408–417.
- [10] Elizabeth L Crockett. "Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature". *American Zoologist* 38.2 (1998), 291–304.
- [11] John D Weete et al. "Phylogenetic distribution of fungal sterols". *PLoS one* 5.5 (2010), e10899.
- [12] Jorma A Virtanen et al. "Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.9 (1998), 4964–4969.
- [13] Gerrit Van Meer et al. "Membrane lipids: where they are and how they behave". *Nature reviews Molecular cell biology* 9.2 (2008), 112–124.
- [14] Bryan A Smith et al. "In vivo optical imaging of acute cell death using a near-infrared fluorescent zinc-dipicolylamine probe". *Molecular pharmaceuticals* 8.2 (2011), 583–590.
- [15] Wade F Zeno et al. "Molecular mechanisms of membrane curvature sensing by a disordered protein". *Journal of the American Chemical Society* 141.26 (2019), 10361–10371.
- [16] J Antoinette Killian. "Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 1376.3 (1998), 401–416.
- [17] Philip L Yeagle. "Cholesterol and the cell membrane". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 822.3-4 (1985), 267–287.
- [18] J Peter Slotte. "Sphingomyelin–cholesterol interactions in biological and model membranes". *Chemistry and physics of lipids* 102.1-2 (1999), 13–27.
- [19] Kai Simons et al. "Cholesterol, lipid rafts, and disease". *The Journal of clinical investigation* 110.5 (2002), 597–603.





- [20] Daniel Lingwood et al. “Lipid rafts as a membrane-organizing principle”. *Science* 327.5961 (2010), 46–50.
- [21] Dmitri Sviridov et al. “Lipid Rafts as a Therapeutic Target: Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts”. *Journal of lipid research* 61.5 (2020), 687–695.
- [22] Ilya Levental et al. “Lipid rafts: controversies resolved, mysteries remain”. *Trends in cell biology* 30.5 (2020), 341–353.
- [23] Reiner Gentz et al. “Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains”. *Science* 243.4899 (1989), 1695–1699.
- [24] William P Russ et al. “The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association”. *Journal of molecular biology* 296.3 (2000), 911–919.
- [25] Benjamin K Mueller et al. “A frequent, GxxxG-mediated, transmembrane association motif is optimized for the formation of interhelical C $\alpha$ -H hydrogen bonds”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.10 (2014), E888–E895.
- [26] Mark G Teese et al. “Role of GxxxG motifs in transmembrane domain interactions”. *Biochemistry* 54.33 (2015), 5125–5135.
- [27] Brayen Grau et al. “The role of hydrophobic matching on transmembrane helix packing in cells”. *Cell Stress* 1.2 (2017), 90.
- [28] Felicity Alcock et al. “Assembling the Tat protein translocase”. *Elife* 5 (2016), e20718.
- [29] Binhan Hao et al. “Hydrophobic mismatch is a key factor in protein transport across lipid bilayer membranes via the Tat pathway”. *Journal of Biological Chemistry* (2022), 101991.
- [30] Denise Mehner-Breitfeld et al. “TatA and TatB generate a hydrophobic mismatch important for the function and assembly of the Tat translocon in Escherichia coli”. *Journal of Biological Chemistry* (2022), 102236.
- [31] Gregory B Cole et al. “Hydrophobic matching of HIV-1 Vpu transmembrane helix-helix interactions is optimized for subcellular location”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1861.10 (2019), 183022.
- [32] Kakoli Mitra et al. “Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101.12 (2004), 4083–4088.
- [33] Amjad Hussain et al. “Oligomerization of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein—a genetic, biochemical and biophysical analysis”. *Virology journal* 4.1 (2007), 1–11.
- [34] Olivier Soubias et al. “Rhodopsin/lipid hydrophobic matching — rhodopsin oligomerization and function”. *Biophysical journal* 108.5 (2015), 1125–1132.
- [35] Shashank Ranjan Srivastava et al. “Hydrophobic mismatch modulates stability and plasticity of human mitochondrial VDAC2”. *Biophysical journal* 115.12 (2018), 2386–2394.
- [36] Rahul Chadda et al. “The dimerization equilibrium of a ClC Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in lipid bilayers”. *Elife* 5 (2016), e17438.
- [37] Sandra Schick et al. “Assembly of the M2 tetramer is strongly modulated by lipid chain length”. *Biophysical journal* 99.6 (2010), 1810–1817.
- [38] Veerappan Anbazhagan et al. “The membrane environment modulates self-association of the human GpA TM domain—implications for membrane protein folding and transmembrane signaling”. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1798.10 (2010), 1899–1907.

- [39] Hiroki Katsuta et al. “Biophysical mechanisms of membrane-thickness-dependent MscL gating: an all-atom molecular dynamics study”. *Langmuir* 35.23 (2018), 7432–7442.
- [40] Dirk Windisch et al. “Hydrophobic mismatch drives the interaction of E5 with the transmembrane segment of PDGF receptor”. *Biophysical journal* 109.4 (2015), 737–749.
- [41] Richard J Webb et al. “Hydrophobic mismatch and the incorporation of peptides into lipid bilayers: a possible mechanism for retention in the Golgi”. *Biochemistry* 37.2 (1998), 673–679.
- [42] Qingqing Lin et al. “Altering hydrophobic sequence lengths shows that hydrophobic mismatch controls affinity for ordered lipid domains (rafts) in the multitransmembrane strand protein perfringolysin O”. *Journal of Biological Chemistry* 288.2 (2013), 1340–1352.
- [43] Michael E Fastenberg et al. “Exclusion of a transmembrane-type peptide from ordered-lipid domains (rafts) detected by fluorescence quenching: extension of quenching analysis to account for the effects of domain size and domain boundaries”. *Biochemistry* 42.42 (2003), 12376–12390.
- [44] Kirsten Bacia et al. “SNAREs Prefer Liquid-disordered over “Raft”(Liquid-ordered) Domains When Reconstituted into Giant Unilamellar Vesicles\*[boxes]”. *Journal of Biological Chemistry* 279.36 (2004), 37951–37955.
- [45] Adriana Vidal et al. “Transbilayer peptide sorting between raft and nonraft bilayers: comparisons of detergent extraction and confocal microscopy”. *Biophysical journal* 89.2 (2005), 1102–1108.
- [46] Lars V Schäfer et al. “Lipid packing drives the segregation of transmembrane helices into disordered lipid domains in model membranes”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.4 (2011), 1343–1348.
- [47] M Villar Van Anthony et al. “Localization and signaling of GPCRs in lipid rafts”. *Methods in cell biology*. Vol. 132. Elsevier, 2016, 3–23.
- [48] Coralie Di Scala et al. “Relevance of CARC and CRAC cholesterol-recognition motifs in the nicotinic acetylcholine receptor and other membrane-bound receptors”. *Current topics in membranes* 80 (2017), 3–23.
- [49] Valentina Corradi et al. “Lipid–protein interactions are unique fingerprints for membrane proteins”. *ACS central science* 4.6 (2018), 709–717.
- [50] Emma Sparr et al. “Self-association of transmembrane  $\alpha$ -helices in model membranes importance of helix orientation and role of hydrophobic mismatch”. *Journal of Biological Chemistry* 280.47 (2005), 39324–39331.
- [51] Norberto Castillo et al. “Free energy of WALP23 dimer association in DMPC, DPPC, and DOPC bilayers”. *Chemistry and physics of lipids* 169 (2013), 95–105.
- [52] Vitaly V Vostrikov et al. “Charged or aromatic anchor residue dependence of transmembrane peptide tilt”. *Journal of Biological Chemistry* 285.41 (2010), 31723–31730.
- [53] Maurits RR de Planque et al. “Different membrane anchoring positions of tryptophan and lysine in synthetic transmembrane  $\alpha$ -helical peptides”. *Journal of Biological Chemistry* 274.30 (1999), 20839–20846.
- [54] Erik Strandberg et al. “Lipid dependence of membrane anchoring properties and snorkeling behavior of aromatic and charged residues in transmembrane peptides”. *Biochemistry* 41.23 (2002), 7190–7198.
- [55] Dragomir Milovanovic et al. “Hydrophobic mismatch sorts SNARE proteins into distinct membrane domains”. *Nature communications* 6 (2015), 5984.

- [56] TV Tolpekina et al. “Simulations of stable pores in membranes: system size dependence and line tension”. *The Journal of chemical physics* 121.16 (2004), 8014–8020.
- [57] Peter I Kuzmin et al. “Line tension and interaction energies of membrane rafts calculated from lipid splay and tilt”. *Biophysical journal* 88.2 (2005), 1120–1133.
- [58] Yusuke Miyazaki et al. “Free energy analysis of membrane pore formation process in the presence of multiple melittin peptides”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1861.7 (2019), 1409–1419.
- [59] Ana J Garcia-Saez et al. “Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes”. *Journal of Biological Chemistry* 282.46 (2007), 33537–33544.
- [60] Richard GW Anderson et al. “A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains”. *Science* 296.5574 (2002), 1821–1825.
- [61] Richard M Epand. “Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains”. *Progress in lipid research* 45.4 (2006), 279–294.
- [62] Jacques Fantini et al. “How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains”. *Frontiers in physiology* 4 (2013), 31.
- [63] Joseph H Lorent et al. “Structural determinants and functional consequences of protein affinity for membrane rafts”. *Nature communications* 8.1 (2017), 1219.
- [64] Jeroen Methorst et al. “Inverse design of cholesterol attracting transmembrane helices reveals a paradoxical role of hydrophobic length”. *bioRxiv* (2021), 2021–07.
- [65] Jane S Richardson. “The anatomy and taxonomy of protein structure”. *Advances in protein chemistry* 34 (1981), 167–339.
- [66] Mee Kyoung Kim et al. “Positional preference of proline in  $\alpha$ -helices”. *Protein Science* 8.7 (1999), 1492–1499.
- [67] Harald Steiner et al. “Intramembrane proteolysis by  $\gamma$ -secretase”. *Journal of Biological Chemistry* 283.44 (2008), 29627–29631.
- [68] Xuemin Xu. “ $\gamma$ -Secretase catalyzes sequential cleavages of the A $\beta$ PP transmembrane domain”. *Journal of Alzheimer’s Disease* 16.2 (2009), 211–224.
- [69] M Paul Murphy et al. “Alzheimer’s disease and the amyloid- $\beta$  peptide”. *Journal of Alzheimer’s disease* 19.1 (2010), 311–323.
- [70] Annakaisa Haapasalo et al. “The many substrates of presenilin/ $\gamma$ -secretase”. *Journal of Alzheimer’s disease* 25.1 (2011), 3–28.
- [71] Nathalie Jurisch-Yaksi et al. “A fast growing spectrum of biological functions of  $\gamma$ -secretase in development and disease”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1828.12 (2013), 2815–2827.
- [72] Suzanne Wahrle et al. “Cholesterol-dependent  $\gamma$ -secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains”. *Neurobiology of disease* 9.1 (2002), 11–23.
- [73] Pamela Osenkowski et al. “Direct and potent regulation of  $\gamma$ -secretase by its lipid microenvironment”. *Journal of Biological Chemistry* 283.33 (2008), 22529–22540.
- [74] Urszula Orzeł et al. “The Role of Cholesterol in Amyloidogenic Substrate Binding to the  $\gamma$ -Secretase Complex”. *Biomolecules* 11.7 (2021), 935.
- [75] Huaqi Xiong et al. “Cholesterol retention in Alzheimer’s brain is responsible for high  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase activities and A $\beta$  production”. *Neurobiology of disease* 29.3 (2008), 422–437.

- [76] Łukasz Nierzwicki et al. “Role of cholesterol in substrate recognition by  $\gamma$ -secretase”. *Scientific Reports* 11.1 (2021), 1–11.
- [77] Bob Lowenberg et al. “Acute myeloid leukemia”. *New England Journal of Medicine* 341.14 (1999), 1051–1062.
- [78] Naranie Shanmuganathan et al. “Treatment of chronic myeloid leukemia: assessing risk, monitoring response, and optimizing outcome”. *Leukemia & lymphoma* 58.12 (2017), 2799–2810.
- [79] Sevitha Bhat et al. “Bacterial infection among cancer patients: analysis of isolates and antibiotic sensitivity pattern”. *International journal of microbiology* 2021 (2021).
- [80] Philip D Lister et al. “Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*”. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 43.1 (1999), 79–86.
- [81] Miriam Hurst et al. “Levofloxacin: an updated review of its use in the treatment of bacterial infections”. *Drugs* 62.14 (2002), 2127–2167.
- [82] Tomasz Kloskowski et al. “Ciprofloxacin and levofloxacin as potential drugs in genitourinary cancer treatment—the effect of dose–response on 2D and 3D cell cultures”. *International Journal of Molecular Sciences* 22.21 (2021), 11970.
- [83] David C Hooper. “Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones”. *Clinical infectious diseases* 32.Supplement\_1 (2001), S9–S15.
- [84] Liam S Redgrave et al. “Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success”. *Trends in microbiology* 22.8 (2014), 438–445.
- [85] Meijun Song et al. “Antibiotic drug levofloxacin inhibits proliferation and induces apoptosis of lung cancer cells through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage”. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84 (2016), 1137–1143.
- [86] Ching-Hsun Wang et al. “Characteristics comparisons of bacteremia in allogeneic and autologous hematopoietic stem cell-transplant recipients with levofloxacin prophylaxis and influence on resistant bacteria emergence”. *Journal of microbiology, immunology and infection* 51.1 (2018), 123–131.
- [87] V Talla et al. “Oxidative stress induced by fluoroquinolones on treatment for complicated urinary tract infections in Indian patients”. *Journal of Young Pharmacists* 3.4 (2011), 304–309.
- [88] MT Garcia et al. “Reactive oxygen species production is a major factor directing the postantibiotic effect of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63.8 (2019), 10–1128.
- [89] Hazel J Shields et al. “Beneficial and detrimental effects of reactive oxygen species on lifespan: a comprehensive review of comparative and experimental studies”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (2021), 181.
- [90] Sara Anselmo et al. “Transportan 10 Induces Perturbation and Pores Formation in Giant Plasma Membrane Vesicles Derived from Cancer Liver Cells”. *Biomolecules* 13.3 (2023), 492.
- [91] Lindsay E Yandek et al. “Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers”. *Biophysical journal* 92.7 (2007), 2434–2444.
- [92] Md Zahidul Islam et al. “Entry of cell-penetrating peptide transportan 10 into a single vesicle by translocating across lipid membrane and its induced pores”. *Biochemistry* 53.2 (2014), 386–396.
- [93] Jan Jakub Lica et al. “Dual-activity fluoroquinolone-transportan 10 Conjugates offer alternative leukemia therapy during hematopoietic cell transplantation”. *Molecular pharmacology* 105.1 (2024), 39–53.



- [94] Natalia Ptaszyńska et al. “Conjugates of ciprofloxacin and levofloxacin with cell-penetrating peptide exhibit antifungal activity and mammalian cytotoxicity”. *International journal of molecular sciences* 21.13 (2020), 4696.
- [95] Victor A Fried et al. “Organic solvents as probes for the structure and function of the bacterial membrane: effects of ethanol on the wild type and an ethanol-resistant mutant of *Escherichia coli* K-12”. *Journal of Bacteriology* 114.1 (1973), 239–248.
- [96] Franklin M Harold. “Antimicrobial agents and membrane function”. *Advances in microbial physiology*. Vol. 4. Elsevier, 1969, 45–104.
- [97] Hans Meyer. “Zur Theorie der Alkoholnarkose: Erste Mittheilung. Welche Eigenschaft der Anästhetica bedingt ihre narkotische Wirkung?” *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 42 (1899), 109–118.
- [98] Charles Ernest Overton. *Studien über die Narkose: zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie*. G. Fischer, 1901.
- [99] Michael J Pringle et al. “Can the lipid theories of anesthesia account for the cutoff in anesthetic potency in homologous series of alcohols?” *Molecular Pharmacology* 19.1 (1981), 49–55.
- [100] Binxing Li et al. “Imaging lutein and zeaxanthin in the human retina with confocal resonance Raman microscopy”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117.22 (2020), 12352–12358.
- [101] Ranganathan Arunkumar et al. “The macular carotenoids: A biochemical overview”. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Molecular and cell biology of lipids* 1865.11 (2020), 158617.
- [102] Made Airanthi K. Widjaja-Adhi et al. “Protective role of carotenoids in the visual cycle”. *The FASEB Journal* 32.11 (2018), 6305–6315.
- [103] Bradley S Henriksen et al. “Importance of carotenoids in optimizing eye and brain development”. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 59.5 (2014), 552.
- [104] Paul S Bernstein et al. “Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease”. *Progress in retinal and eye research* 50 (2016), 34–66.
- [105] Justyna Widomska et al. “Why is zeaxanthin the most concentrated xanthophyll in the central fovea?” *Nutrients* 12.5 (2020), 1333.
- [106] Rafal Luchowski et al. “Light-modulated sunscreen mechanism in the retina of the human eye”. *The Journal of Physical Chemistry B* 125.23 (2021), 6090–6102.
- [107] Takanori Nakane et al. “Single-particle cryo-EM at atomic resolution”. *Nature* 587.7832 (2020), 152–156.
- [108] George R Heath et al. “Localization atomic force microscopy”. *Nature* 594.7863 (2021), 385–390.
- [109] Helen R Saibil. “Conformational changes studied by cryo-electron microscopy”. *nature structural biology* 7.9 (2000), 711–714.
- [110] Wolfgang P Schleich et al. “Schrödinger equation revisited”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.14 (2013), 5374–5379.
- [111] Max Born et al. “Zur quantentheorie der molekeln”. *Original Scientific Papers Wissenschaftliche Originalarbeiten*. Springer, 1985, 216–246.
- [112] Hans Hellmann et al. “Einführung in die Quantenchemie” (1937).
- [113] Richard Phillips Feynman. “Forces in molecules”. *Physical review* 56.4 (1939), 340.



- [114] Arieh Warshel et al. "Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme". *Journal of molecular biology* 103.2 (1976), 227–249.
- [115] David E Shaw. "Millisecond-long molecular dynamics simulations of proteins on a special-purpose machine". *Biophysical Journal* 104.2 (2013), 45a.
- [116] Weile Jia et al. "Pushing the limit of molecular dynamics with ab initio accuracy to 100 million atoms with machine learning". *SC20: International conference for high performance computing, networking, storage and analysis*. IEEE. 2020, 1–14.
- [117] Loup Verlet. "Computer" experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules". *Physical review* 159.1 (1967), 98.
- [118] Søren Toxvaerd et al. "Energy conservation in molecular dynamics simulations of classical systems". *The Journal of chemical physics* 136.22 (2012), 224106.
- [119] William C Swope et al. "A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters". *The Journal of chemical physics* 76.1 (1982), 637–649.
- [120] Herbert E Salzer. "Osculatory extrapolation and a new method for the numerical integration of differential equations". *Journal of the Franklin Institute* 262.2 (1956), 111–119.
- [121] Wilfred F Van Gunsteren et al. "A leap-frog algorithm for stochastic dynamics". *Molecular Simulation* 1.3 (1988), 173–185.
- [122] Benedict J Leimkuhler et al. "Integration methods for molecular dynamics". *Mathematical Approaches to biomolecular structure and dynamics*. Springer, 1996, 161–185.
- [123] Fritz London. "Zur theorie und systematik der molekularkräfte". *Zeitschrift für Physik* 63.3-4 (1930), 245–279.
- [124] CRA Catlow et al. "Interionic potentials for alkali halides". *Journal of Physics C: Solid State Physics* 10.9 (1977), 1395.
- [125] Jeffrey J Potoff et al. "Mie potentials for phase equilibria calculations: Application to alkanes and perfluoroalkanes". *The Journal of Physical Chemistry B* 113.44 (2009), 14725–14731.
- [126] Anthony K Rappé et al. "UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations". *Journal of the American chemical society* 114.25 (1992), 10024–10035.
- [127] Scott J Weiner et al. "A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins". *Journal of the American Chemical Society* 106.3 (1984), 765–784.
- [128] Alexander D MacKerell Jr et al. "CHARMM: the energy function and its parameterization". *Encyclopedia of computational chemistry* 1 (2002).
- [129] Walter RP Scott et al. "The GROMOS biomolecular simulation program package". *The Journal of Physical Chemistry A* 103.19 (1999), 3596–3607.
- [130] Sangrak Kim. "Issues on the choice of a proper time step in molecular dynamics". *Physics Procedia* 53 (2014), 60–62.
- [131] C.E. Shannon. "Communication in the Presence of Noise". *Proceedings of the IRE* 37.1 (Jan. 1949), 10–21.
- [132] Vincent Kräutler et al. "A fast SHAKE algorithm to solve distance constraint equations for small molecules in molecular dynamics simulations". *Journal of computational chemistry* 22.5 (2001), 501–508.



- [133] Hans C Andersen. “Rattle: A “velocity” version of the shake algorithm for molecular dynamics calculations”. *Journal of computational Physics* 52.1 (1983), 24–34.
- [134] Berk Hess et al. “LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations”. *Journal of computational chemistry* 18.12 (1997), 1463–1472.
- [135] Daan Frenkel et al. *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications*. Vol. 1. Elsevier, 2001.
- [136] Herman JC Berendsen et al. “Molecular dynamics with coupling to an external bath”. *The Journal of chemical physics* 81.8 (1984), 3684–3690.
- [137] Shuichi Nosé. “A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods”. *The Journal of chemical physics* 81.1 (1984), 511–519.
- [138] William G Hoover. “Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions”. *Physical review A* 31.3 (1985), 1695.
- [139] Michele Parrinello et al. “Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method”. *Journal of Applied physics* 52.12 (1981), 7182–7190.
- [140] Glenn M Torrie et al. “Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling”. *Journal of Computational Physics* 23.2 (1977), 187–199.
- [141] Shankar Kumar et al. “The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method”. *Journal of computational chemistry* 13.8 (1992), 1011–1021.
- [142] Ruxi Qi et al. “Replica exchange molecular dynamics: a practical application protocol with solutions to common problems and a peptide aggregation and self-assembly example”. *Peptide Self-Assembly: Methods and Protocols* (2018), 101–119.
- [143] Alessandro Laio et al. “Escaping free-energy minima”. *Proceedings of the national academy of sciences* 99.20 (2002), 12562–12566.
- [144] Paolo Raiteri et al. “Efficient reconstruction of complex free energy landscapes by multiple walkers metadynamics”. *The journal of physical chemistry B* 110.8 (2006), 3533–3539.
- [145] Alessandro Barducci et al. “Well-tempered metadynamics: a smoothly converging and tunable free-energy method”. *Physical review letters* 100.2 (2008), 020603.
- [146] Michael R Shirts et al. “Alchemical free energy calculations: ready for prime time?” *Annual reports in computational chemistry* 3 (2007), 41–59.
- [147] Charles H Bennett. “Efficient estimation of free energy differences from Monte Carlo data”. *Journal of Computational Physics* 22.2 (1976), 245–268.
- [148] Miguel Jorge et al. “Effect of the integration method on the accuracy and computational efficiency of free energy calculations using thermodynamic integration”. *Journal of Chemical Theory and Computation* 6.4 (2010), 1018–1027.
- [149] Antonia SJS Mey et al. “Best practices for alchemical free energy calculations [article v1. 0]”. *Living journal of computational molecular science* 2.1 (2020).
- [150] David Van Der Spoel et al. “GROMACS: Fast, flexible, and free”. *Journal of Computational Chemistry* 26.16 (2005), 1701–1718.
- [151] James C. Phillips et al. “Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD”. *The Journal of Chemical Physics* 153.4 (2020).

- [152] Sunhwan Jo et al. “CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM”. *Journal of computational chemistry* 29.11 (2008), 1859–1865.
- [153] Christopher J Knight et al. “MemGen: A general web server for the setup of lipid membrane simulation systems”. *Bioinformatics* 31.17 (2015), 2897–2899.
- [154] Jing Huang et al. “CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data”. *Journal of computational chemistry* 34.25 (2013), 2135–2145.
- [155] Kresten Lindorff-Larsen et al. “Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field”. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78.8 (2010), 1950–1958.
- [156] Joakim P. M. Jämbeck et al. “Derivation and Systematic Validation of a Refined All-Atom Force Field for Phosphatidylcholine Lipids”. *The Journal of Physical Chemistry B* 116.10 (2012), 3164–3179.
- [157] Joakim P. M. Jämbeck et al. “An Extension and Further Validation of an All-Atomistic Force Field for Biological Membranes”. *Journal of Chemical Theory and Computation* 8.8 (2012), 2938–2948.
- [158] Joakim P. M. Jämbeck et al. “Another Piece of the Membrane Puzzle: Extending Slipids Further”. *Journal of Chemical Theory and Computation* 9.1 (2013), 774–784.
- [159] William L. Jorgensen et al. “Comparison of simple potential functions for simulating liquid water”. *The Journal of Chemical Physics* 79.2 (1983), 926–935.
- [160] RW Pastor. “Techniques and applications of Langevin dynamics simulations”. *The Molecular Dynamics of Liquid Crystals*. Springer, 1994, 85–138.
- [161] Scott E Feller et al. “Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method”. *The Journal of chemical physics* 103.11 (1995), 4613–4621.
- [162] Ulrich Essmann et al. “A smooth particle mesh Ewald method”. *The Journal of chemical physics* 103.19 (1995), 8577–8593.
- [163] Berk Hess. “P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation”. *Journal of chemical theory and computation* 4.1 (2008), 116–122.
- [164] Gareth A. Tribello et al. “PLUMED 2: New feathers for an old bird”. *Computer Physics Communications* 185.2 (2014), 604–613.
- [165] B. Efron. “Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife”. *The Annals of Statistics* 7.1 (1979), 1–26.
- [166] Vytautas Gapsys et al. “Computational analysis of local membrane properties”. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 27.10 (2013), 845–858.
- [167] Guido Van Rossum et al. *Python 3 Reference Manual*. Scotts Valley, CA: CreateSpace, 2009. ISBN: 1441412697.
- [168] William Humphrey et al. “VMD: Visual molecular dynamics”. *Journal of Molecular Graphics* 14.1 (1996), 33–38.
- [169] Thomas Steinbrecher et al. “Soft-core potentials in thermodynamic integration: Comparing one-and two-step transformations”. *Journal of computational chemistry* 32.15 (2011), 3253–3263.
- [170] Thomas C Beutler et al. “Avoiding singularities and numerical instabilities in free energy calculations based on molecular simulations”. *Chemical physics letters* 222.6 (1994), 529–539.
- [171] Nicholas Metropolis et al. “Equation of state calculations by fast computing machines”. *The journal of chemical physics* 21.6 (1953), 1087–1092.

- [172] Xiao-chen Bai et al. “Sampling the conformational space of the catalytic subunit of human  $\gamma$ -secretase”. *4* (2015), e11182.
- [173] Paul J. Barrett et al. “The Amyloid Precursor Protein Has a Flexible Transmembrane Domain and Binds Cholesterol”. *Science* 336.6085 (2012), 1168–1171.
- [174] Erik Lindahl et al. “GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis”. *Molecular modeling annual* 7 (2001), 306–317.
- [175] OpenCV. *Open Source Computer Vision Library*. 2015.
- [176] J. Wohlert et al. “Free energy of a trans-membrane pore calculated from atomistic molecular dynamics simulations”. *The Journal of Chemical Physics* 124.15 (2006).
- [177] Kathleen Boesze-Battaglia et al. “Fatty acid composition of bovine rod outer segment plasma membrane”. *Experimental eye research* 49.4 (1989), 699–701.
- [178] Thomas M Weiss et al. “Hydrophobic mismatch between helices and lipid bilayers”. *Biophysical journal* 84.1 (2003), 379–385.
- [179] Armando J de Jesus et al. “The determinants of hydrophobic mismatch response for transmembrane helices”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1828.2 (2013), 851–863.
- [180] B Bechinger et al. “Orientations of amphipathic helical peptides in membrane bilayers determined by solid-state NMR spectroscopy”. *Journal of biomolecular NMR* 1 (1991), 167–173.
- [181] Hwankyu Lee et al. “Molecular dynamics simulations of the anchoring and tilting of the lung-surfactant peptide SP-B1-25 in palmitic acid monolayers”. *Biophysical journal* 89.6 (2005), 3807–3821.
- [182] Tristan Ursell et al. “Cooperative gating and spatial organization of membrane proteins through elastic interactions”. *PLoS computational biology* 3.5 (2007), e81.
- [183] Bhagyashree D Rao et al. “Hydrophobic mismatch in membranes: when the tail matters”. *Membrane organization and dynamics* (2017), 375–387.
- [184] Sanjay Mall et al. “Self-association of model transmembrane  $\alpha$ -helices is modulated by lipid structure”. *Biochemistry* 40.41 (2001), 12379–12386.
- [185] Juanjuan Su et al. “Localization preference of antimicrobial peptides on liquid-disordered membrane domains”. *Frontiers in cell and developmental biology* 8 (2020), 350.
- [186] Drew Marquardt et al. “Lipid bilayer thickness determines cholesterol’s location in model membranes”. *Soft matter* 12.47 (2016), 9417–9428.
- [187] Rebecca D Usery et al. “Line tension controls liquid-disordered+ liquid-ordered domain size transition in lipid bilayers”. *Biophysical journal* 112.7 (2017), 1431–1443.
- [188] Külliki Saar et al. “Cell-penetrating peptides: a comparative membrane toxicity study”. *Analytical biochemistry* 345.1 (2005), 55–65.
- [189] Rusiecka Izabela et al. “Transportan 10 improves the anticancer activity of cisplatin”. *Naunyn-schmiedeberg’s Archives of Pharmacology* 389 (2016), 485–497.
- [190] C Scomparin et al. “Diffusion in supported lipid bilayers: Influence of substrate and preparation technique on the internal dynamics”. *The European Physical Journal E* 28 (2009), 211–220.
- [191] Ruthven NAH Lewis et al. “Calorimetric and spectroscopic studies of the phase behavior and organization of lipid bilayer model membranes composed of binary mixtures of dimyristoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylglycerol”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1668.2 (2005), 203–214.

- [192] Kristyna Pluhackova et al. “A critical comparison of biomembrane force fields: structure and dynamics of model DMPC, POPC, and POPE bilayers”. *The Journal of Physical Chemistry B* 120.16 (2016), 3888–3903.
- [193] Robert H Spector. “The pupils”. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition (1990).

## Spis rysunków

1.1	Niedopasowanie hydrofobowe – definicja . . . . .	3
1.2	Struktura $\gamma$ -sekreazy . . . . .	10
1.3	Wpływ cholesterolu na powinowactwo APP do $\gamma$ -sekreazy. . . . .	11
1.4	Wzór strukturalny lewofloksacyny . . . . .	12
1.5	Struktury chemiczne karotenoidów obecnych w siatkówce oka . . . . .	14
3.1	Schematyczne zobrazowanie kąta walencyjnego . . . . .	21
3.2	Schematyczne zobrazowanie kąta torsyjnego właściwego i niewłaściwego . . . . .	22
3.3	Przykładowa krzywa opisująca oddziaływania dyspersyjne – potencjał Lennarda-Jonesa . . . . .	23
3.4	Periodyczne warunki brzegowe – schematyczne przedstawienie konceptu . . . . .	27
3.5	Schematyczne przedstawienie techniki próbkowania parasolkowego. . . . .	31
3.6	Schemat wyznaczania krzywej energii swobodnej przy pomocy metadynamiki. . . . .	33
3.7	Przykładowy cykl termodynamiczny służący do wyznaczenia względnych zmian energii swobodnej wiązania między ligandem a receptorem w odpowiedzi na zmianę struktury chemicznej cząsteczki. . . . .	35
3.8	Schematyczne zobrazowanie procesu tworzenia ujemnego niedopasowania hydrofobowego . . . . .	37
3.9	Cykl termodynamiczny służący do wyznaczania zmian energii swobodnej towarzyszącej tworzeniu ujemnego niedopasowania hydrofobowego . . . . .	39
3.10	Cykl termodynamiczny służący do wyznaczania zmian energii swobodnej towarzyszącej dimeryzacji inkluzji . . . . .	40
3.11	Układ symulacyjny z błoną złożoną z dwóch odseparowanych domen o różnym stopniu uporządkowania lipidów . . . . .	41
3.12	Cykl termodynamiczny służący do wyznaczania zmian energii swobodnej towarzyszącej przeniesieniu inkluzji między domenami o różnym stopniu uporządkowania . . . . .	42
3.13	Struktura cząsteczki DMPC . . . . .	44
3.14	Struktura zeaksantyny oraz definicja współrzędnej reakcji wykorzystanej do badania energetyki reorientacji cząsteczki w błonie . . . . .	47
4.1	Model inkluzji transbłonowej osadzony w błonie lipidowej. . . . .	49
4.2	Porównanie radialnych funkcji rozkładu (RDF) lipidów DMPC wokół peptydu WALP oraz modelowej inkluzji. . . . .	51
4.3	Zmiana energii swobodnej towarzysząca utworzeniu ujemnego niedopasowania hydrofobowego . . . . .	53



4.4	Różnicowe profile gęstości wody oraz grup fosforanowych w układzie DOPC/DEPC w odpowiedzi na wprowadzenie inkluzji . . . . .	55
4.5	Profile energii swobodnej opisujące dimeryzację inkluzji w błonie uporządkowanej w przypadku ujemnego niedopasowania hydrofobowego . . . . .	57
4.6	Różnicowe mapy lokalnej grubości błony (DMPC/CHL) w przypadku ujemnego niedopasowania hydrofobowego . . . . .	58
4.7	Profile energii swobodnej dla procesu dimeryzacji inkluzji w błonie uporządkowanej (DMPC/CHL) w przypadku zerowego bądź dodatniego niedopasowania hydrofobowego . . . . .	59
4.8	Rozkład kąta przechylenia inkluzji w błonie DMPC/CHL przy dodatnim niedopasowaniu hydrofobowym . . . . .	60
4.9	Profile energii swobodnej dla dimeryzacji inkluzji w błonie nieuporządkowanej (DOPC) dla przypadku zerowego, ujemnego oraz dodatniego niedopasowania hydrofobowego . . . . .	61
4.10	Mapy lokalnej grubości błony w przypadku ujemnego niedopasowania hydrofobowego w dwóch różnych błonach . . . . .	62
4.11	Zmiany energii swobodnej towarzyszące dimeryzacji inkluzji uzyskane za pomocą podejścia alchemicznego . . . . .	64
4.12	Rozkład zmian gęstości wody w wyniku dimeryzacji inkluzji w przypadku ujemnego $\Delta D$ . . . . .	65
4.13	Rozkład różnic gęstości grup fosforanowych lipidów w odpowiedzi na dimeryzację inkluzji w przypadku ujemnego oraz dodatniego $\Delta D$ . . . . .	67
4.14	Rozkład różnic gęstości wody i grup fosforanowych dla dimeryzacji peptydów o ujemnym $\Delta D$ w błonach o różnym upakowaniu lipidów . . . . .	68
4.15	Profile energii swobodnej opisujące dimeryzację w błonie uporządkowanej w zależności od sumarycznego ładunku inkluzji . . . . .	70
4.16	Mapy lokalnej grubości błony (DMPC/CHL) zawierającej inkluzję, dla której $\Delta D = -0.6$ nm, w zależności od sumarycznego ładunku inkluzji . . . . .	71
4.17	Zmiana energii swobodnej towarzysząca przeniesieniu inkluzji z domeny uporządkowanej do nieuporządkowanej z dekompozycją na wkłady elektrostatyczny i dyspersyjny . . . . .	74
4.18	Zmiana energii swobodnej towarzysząca przeniesieniu inkluzji z domeny uporządkowanej do nieuporządkowanej z dekompozycją na wkłady związane z oddziaływaniami inkluzji z wodą lub błoną . . . . .	75
4.19	Różnicowe profile gęstości wody w układzie DMPC/CHL i DOPC w odpowiedzi na wprowadzenie inkluzji o ujemnym oraz zerowym niedopasowaniu hydrofobowym . . . . .	76





4.20	Różnicowe profile gęstości wody w układzie DMPC/CHL i DOPC w odpowiedzi na wprowadzenie inkluzji o ujemnym oraz zerowym niedopasowaniu hydrofobowym . . . . .	77
4.21	Zmiana energii swobodnej towarzysząca przeniesieniu inkluzji z domeny uporządkowanej ( $\Delta D = 0$ nm) do nieuporządkowanej (o różnym $\Delta D$ ) . . . . .	78
4.22	Różnicowe profile gęstości wody w układzie DEPC-DMPC/CHL w odpowiedzi na wprowadzenie inkluzji . . . . .	79
4.23	Zmiana energii swobodnej towarzysząca przeniesieniu karotenoidu z domeny uporządkowanej do nieuporządkowanej . . . . .	81
4.24	Kontrolowanie udziału oddziaływań elektrostatycznych poprzez zmianę momentu dipolowego . . . . .	82
4.26	Różnicowe profile gęstości wody w układach DMPC/CHL i DOPC w odpowiedzi na wprowadzenie cząsteczki zeaksantyny . . . . .	83
4.25	Wzór strukturalny astaksantyny . . . . .	83
4.27	Zmiana energii swobodnej towarzysząca przeniesieniu peptydów WALP i KALP z domeny uporządkowanej do nieuporządkowanej . . . . .	84
4.28	Różnicowe profile gęstości wody w układzie DMPC/CHL i DOPC w odpowiedzi na wprowadzenie peptydów WALP i KALP . . . . .	85
4.29	Struktura peptydów L11 oraz KALP21 . . . . .	88
4.30	Profile energii swobodnej opisujące asocjację cholesterolu do peptydów L11 oraz KALP21 . . . . .	89
4.31	Lokalna grubość hydrofobowego rdzenia błony POPC/CHL w funkcji odległości od peptydu L11 lub KALP21 . . . . .	90
4.32	Profile energii oddziaływań pomiędzy cząsteczką cholesterolu a pozostałymi elementami systemu zawierającego peptyd L11 . . . . .	91
4.33	Różnicowe mapy lokalnej grubości błony w sąsiedztwie $\gamma$ -sekreazy oraz APP – symulacje równowagowe . . . . .	93
4.34	Profile gęstości fosforanów względem osi prostopadłej do powierzchni błony w otoczeniu h69, APP oraz czystej błonie oraz korespondujące z nimi parametry uporządkowania łańcuchów lipidowych . . . . .	95
4.35	Mapy lokalnej grubości błony w otoczeniu APP oraz h69 $\gamma$ -sekreazy pozwalające na oszacowanie zmian obszaru zaburzenia błony w trakcie asocjacji cząsteczek . . . . .	96
4.36	Energia przeniesienia koniugatu TP10 – NH <sub>2</sub> – LVX w zależności od odległości od środka błony oraz analiza otoczenia tetrameru TP10 – NH <sub>2</sub> – LVX, wskazująca na formowanie się porów wodnych. . . . .	99
4.37	Reprezentatywna klatka z symulacji dynamiki molekularnej przedstawiająca koniugat TP10 – NH <sub>2</sub> – LVX w orientacji dominującej w błonie POPC . . . . .	101



4.38	Wyznaczone gęstości wody wzdłuż środka błony POPC zawierającej tetramer TP10–NH <sub>2</sub> –LVX . . . . .	102
4.39	Grubości błony DMPC wzbogaconej alkoholami o różnej długości hydrofobowej . . . . .	105
4.40	Zależność współczynnika uporządkowania S <sub>CD</sub> w błonie DMPC wzbogaconej alkoholami o różnej długości hydrofobowej, w różnych temperaturach .	107
4.41	Schemat przedstawiający sposób oceny stopnia nakładania się warstw lipidowych między sobą . . . . .	109
4.42	Profile gęstości terminalnych atomów węgla DMPC oraz wszystkich atomów węgla w alkoholach w temperaturze 47°C . . . . .	110
4.43	Schematyczna reprezentacja odpowiedzi układu na niedopasowanie hydrofobowe wynikające z różnicy długości między łańcuchem alkilowym alkoholu i łańcuchem acylowym lipidu . . . . .	112
4.44	Reprezentatywna struktura błony DPPC zawierającej zeaksantynę w konformacji all-trans otrzymana w symulacji dynamiki molekularnej wraz z oznaczeniami parametrów używanych w obliczeniach . . . . .	114
4.45	Zmiany energii swobodnej towarzyszące reorientacji cząsteczki zeaksantyny w błonie DPPC . . . . .	115
4.46	Zmiany energii swobodnej towarzyszące reorientacji cząsteczki zeaksantyny w błonie o składzie odpowiadającym błonom komórkowym neuronów siatkówki oka . . . . .	116
4.47	Reprezentatywne klatki z symulacji dynamiki molekularnej przedstawiające zeaksantynę w orientacjach dominujących dla poszczególnych izomerów w błonie DPPC. . . . .	117
4.48	Prawdopodobieństwo znalezienia grup hydroksylowych Zea w różnych odległościach od środka błony . . . . .	118

## Spis tabel

1	Zestaw parametrów opisujących model transbłonowej inkluzji . . . . .	51
2	Zmiany liczby nadmiarowych cząsteczek wody w procesie dimeryzacji inkluzji, w zależności od wartości niedopasowania hydrofobowego. . . . .	66
3	Wpływ usztywniania orientacji inkluzji na zmianę liczby nadmiarowych cząsteczek wody na skutek dimeryzacji. . . . .	67
4	Zmiany liczby nadmiarowych cząsteczek wody w procesie dimeryzacji inkluzji w zależności od ładunku elektrycznego inkluzji. . . . .	71