



## Biofizyczne badania błon i białek metodą symulacji dynamiki molekularnej

Marta Pasenkiewicz-Gierula<sup>1</sup>, Grzegorz Jeziński<sup>1</sup>,  
Krzysztof Murzyn<sup>1</sup>, Tomasz Róg<sup>1</sup>, Cezary Czaplewski<sup>2</sup>,  
Jerzy Ciarkowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

<sup>2</sup>Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

### Biophysical Studies of Membranes and Proteins Using the Molecular Dynamics Simulation Method

#### Summary

The main structural element of biological membranes is a liquid-crystalline lipid bilayer. Other constituents i.e. proteins, sterols and carbohydrates, either intercalate into or loosely attach to the bilayer. Many properties common to the membranes can be explored by studying lipid bilayers. In this paper, the molecular dynamics simulation method was applied to study membranes at various levels of compositional complexity. Whenever it was possible, results of the simulations were compared with published experimental data.

The reactive site loop of  $\alpha_1$ -antitrypsin is held in a tightly constrained conformation by a salt bridge between Glu342 and Lys290. Guanidinium ions induce  $\alpha_1$ -antitrypsin polymerisation by disrupting this salt bridge. The mechanism of this process, proposed on the basis of experimental studies, was confirmed and further explained by molecular modelling methods.

#### Key words:

molecular modelling, phosphatidylcholine bilayers, cholesterol, magainin-2, vasopressin receptor,  $\alpha_1$ -antitrypsin.

#### Adres do korespondencji

Marta Pasenkiewicz-Gierula,  
Instytut Biologii  
Molekularnej,  
Uniwersytet Jagielloński,  
al. Mickiewicza 3,  
31-120 Kraków;  
e-mail:  
mpg@mol.uj.edu.pl

## 1. Wstęp

Błony biologiczne otaczają nie tylko każdą żywą komórkę, ale też struktury subkomórkowe. Ich podstawową funkcją jest zapewnienie integralności komórki, umożliwienie jej kompart-

mentyzacji, kontrola transportu materii do wnętrza i na zewnątrz oraz w obrębie komórki, a także odbieranie i przekazywanie sygnałów istotnych dla funkcjonowania komórki.

Głównym elementem strukturalnym błony biologicznej jest dwuwarstwa lipidowa (lipidowa warstwa podwójna). W niej rozmieszczone są białka i inne naturalne składniki błony. Lipidy, białka oraz pozostałe cząsteczki utrzymywane są w obrębie błony poprzez oddziaływania niekowalencyjne. Matryca lipidowa błon komórek eukariotycznych zbudowana jest najczęściej z fosfolipidów. Są to cząsteczki amfipatyczne o hydrofobowych łańcuchach węglowodorowych i hydrofilowych głowach polarnych. Głowy polarne wyeksponowane są do fazy wodnej, a łańcuchy tworzą hydrofobowe wnętrze błony. To wnętrze charakteryzuje się znaczną „płynnością”, umożliwiającą błonie pełnienie funkcji biologicznych – płynność tę zapewnia ciekłokrystaliczna faza warstwy podwójnej.

Dwuwarstwa lipidowa stanowi zatem istotny element strukturalny błony, dostarcza odpowiedniego środowiska dla integralnych i peryferyjnych białek błonowych umożliwiając ich funkcjonowanie oraz stanowi barierę dla biernego transportu polarnych i niepolarnych cząsteczek przez błonę.

Celem opisanych w tej pracy badań nad błonami jest poznanie podstawowych mechanizmów molekularnych funkcjonowania błon. Mechanizmy te są trudne do wyjaśnienia metodami eksperymentalnymi, ze względu na ich ograniczoną rozdzielczość przestrzenną i czasową. Ponieważ metoda symulacji dynamiki molekularnej pozwala na wyjaśnienie atomowych podstaw struktury i dynamiki układów molekularnych, w badaniach użyto właśnie tej metody (1). Wyjaśnienie atomowych podstaw funkcjonowania błon biologicznych ma ważny aspekt biotechnologiczny i aplikacyjny, chociażby przy racjonalnym projektowaniu leków i ich postaci.

Ze względu na wielką złożoność strukturalną i dynamiczną błon, opisane badania rozpoczęto od określenia struktury i dynamiki najprostszego modelu błony, tj. uwodnionej dwuwarstwy lipidowej, która jednakże stanowi jej najważniejszy element strukturalny. Następnie, stopniowo zwiększano złożoność układu przez kolejne dodawanie do dwuwarstwy innych naturalnych składników błony, takich jak sterole, peptydy i integralne białka błonowe w celu określenia struktury i dynamiki utworzonych układów.

Metody modelowania molekularnego zastosowano również do badania białka osocza,  $\alpha_1$ -antytrypsyny.  $\alpha_1$ -antytrypsyna jest inhibitorem proteaz serynowych należącym do grupy serpin (2). Cechy strukturalne o dużym znaczeniu dla funkcji  $\alpha_1$ -antytrypsyny, to: eksponowana do roztworu pętla reaktywna, na której mieści się centrum reakcji inhibicji, duży arkusz  $\beta$  (A) i mały arkusz  $\beta$  (C). Pętla reaktywna jest łańcuchem łączącym arkusze A i C (3; 4). Oprócz reakcji inhibicji,  $\alpha_1$ -antytrypsyna indukuje też rozpad złogów amyloidowych powstałych przez agregację niektórych peptydów (5); jest to przypuszczalnie wynikiem tworzenia specyficznych kompleksów  $\alpha_1$ -antytrypsyna-peptyd, co z kolei powoduje polimeryzację białka. Istotne jest zatem zbadanie oddziaływania  $\alpha_1$ -antytrypsyny ze specyficznymi peptydami

oraz ligandami, indukującymi jej polimeryzację. Najczęściej występującą formą patologiczną ludzkiej  $\alpha_1$ -antytrypsyny jest mutant Z (Glu342→Lys). Mutacja ta implikuje brak mostka solnego Glu342-Lys290, co również prowadzi do polimeryzacji cząsteczek białka. Jednakże, podobne zmiany indukowane są przez niektóre substancje denaturujące, głównie chlorowodorek guanidyny (2).

Opisane w pracy badania za pomocą metod modelowania molekularnego miały na celu otrzymanie struktury białka natywnego z formy ciętej, zbadanie jej zachowania dynamicznego oraz potwierdzenie otrzymanych wcześniej wyników eksperymentalnych (6,7).

## 2. Uwodnione dwuwarstwy lipidowe

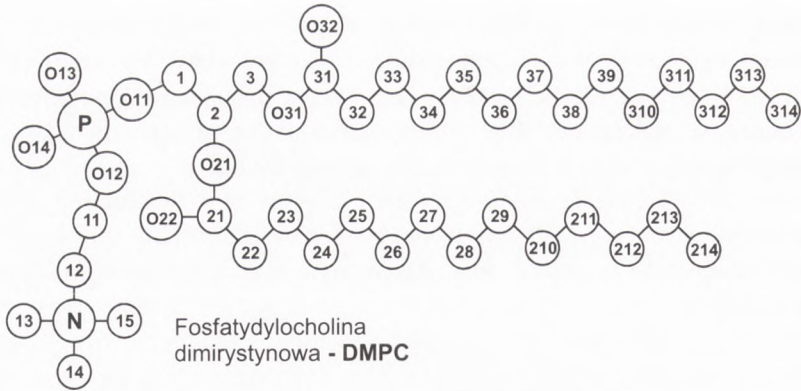
W pierwszej fazie badań nad błonami użyto trzech komputerowych modeli uwodnionych błon fosfolipidowych. Modele błon utworzono z fosfatydylocholin (PC): 1) dimirystynowej (DMPC), 2) palmitynowo-oleinowej (POPC) oraz 3) palmitynowo-elaidynowej (PEPC). Wymienione trzy fosfolipidy mają identyczne głowy polarne, ale różnią się długością łańcuchów węglowodorowych oraz obecnością wiązania podwójnego w łańcuchu  $\beta$  (por. rys. 1). Łańcuchy  $\beta$  i  $\gamma$  DMPC (oba 14-węglowe) oraz łańcuch  $\gamma$  (16-węglowy) POPC i PEPC są w pełni nasycone (wszystkie wiązania C-C są pojedyncze). Łańcuch  $\beta$  (18-węglowy) POPC i PEPC jest mononienasycony, tj. posiada jedno podwójne wiązanie między C9 i C10. Podwójne wiązanie w łańcuchu  $\beta$  POPC ma konformację *cis*, a PEPC ma konformację *trans* (por. rys. 1). POPC często występuje w przyrodzie, podczas gdy PEPC bardzo rzadko. Pośrednim celem badań nad dwuwarstwami jest wyjaśnienie dlaczego na pozór drobna zmiana konformacji wiązania podwójnego z *cis* na *trans* powoduje, że PEPC staje się lipidem biologicznie mniej użytecznym.

Ważnym elementem badań metodą symulacji dynamiki molekularnej jest weryfikacja modelu względem wyników doświadczalnych. Chociaż DMPC nie jest najbardziej reprezentatywnym fosfolipidem dla błon biologicznych, ze względu na znaczną liczbę danych doświadczalnych dotyczących błon zbudowanych z DMPC, badania opisane w tej pracy rozpoczęto od błony DMPC. Pozwoliło to na wszechstronne porównanie układu symulacyjnego z eksperymentalnym i krytyczną ocenę przydatności metod symulacyjnych do badań błon oraz wprowadzenie drobnych modyfikacji do programów symulacyjnych.

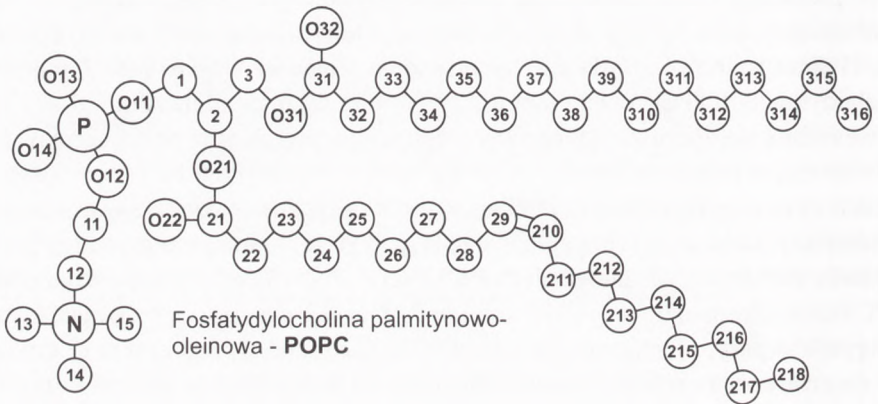
Użyte w badaniach modele błon zbudowano z 72 ( $6 \times 6 \times 2$ ) cząsteczek PC oraz cząsteczek wody w takiej liczbie, aby woda stanowiła 39% wagowych układu. Symulacje prowadzono przez czas dłuższy niż 5 ns. Czas równoważenia układów wynosił więcej niż 1 ns. Do analiz użyto co najmniej 2 ns trajektorii. Szczegółowe opisy budowy układów błonowych oraz prowadzonych symulacji podano w pracach (8-10).

Analizy wygenerowanych w symulacjach trajektorii dostarczyły zarówno wyników dostępnych jak i niedostępnych dla badań eksperymentalnych. Pierwsze po-

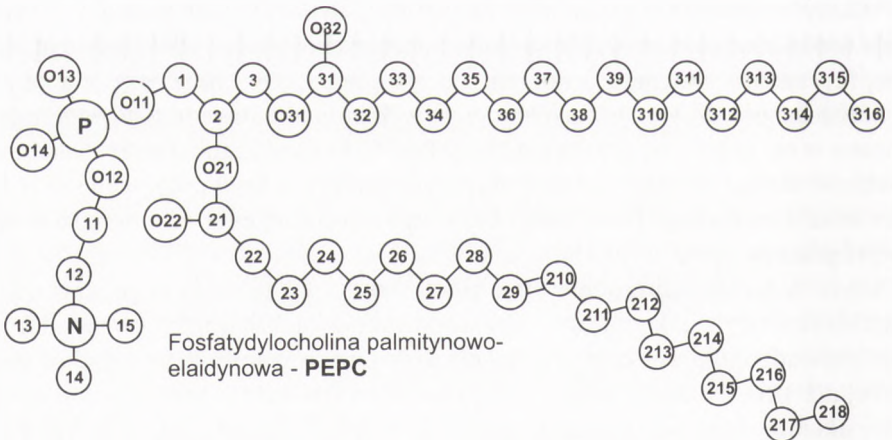
a



b



c



Rys. 1. Struktury i nazwy atomów fosfatydylocholin: a – dimirystynowej (DMPC), b – palmitynowo-oleinowej (POPC), c – palmitynowo-elaidynowej (PEPC).

służyły do weryfikacji modeli, a drugie znacznie wzbogaciły naszą wiedzę o strukturze i dynamicznym zachowaniu błon w skali nanosekundowej.

Badania eksperymentalne błon zazwyczaj dotyczą jednego z trzech obszarów: a) całej błony, b) hydrofobowego wnętrza błony, c) interfazy błona/woda. Parametry charakteryzujące całą błonę (parametry globalne) to powierzchnia przypadająca na PC w błonie, grubość błony oraz profil gęstości elektronowej. Nieuporządkowanie, dynamiczny charakter oraz brak przepuszczalności dla cząstek polarnych hydrofobowego wnętrza charakteryzują: liczba konformacji *gauche* w łańcuchu, molekularny parametr uporządkowania  $S_{mol}$ , czasy życia konformacji *trans* i *gauche* oraz profil hydrofobowości błony. Wieloskładnikowość, polarność i specyficzność oddziaływań charakteryzujące interfazę błona/woda opisują takie wielkości jak: liczba cząsteczek wody silnie związanych z PC, pomosty wodne tworzone przez cząsteczki wody równocześnie związane wodorowo z dwoma cząsteczkami PC, pary ładunkowe (mostki solne) tworzone przez dodatnio naładowaną grupę cholinową jednej cząsteczki PC i ujemnie naładowaną grupę fosforanową lub karbonylową innej cząsteczki PC, liczba międzycząsteczkowych połączeń przypadająca na cząsteczkę lipidu w błonie. Średnie wartości dla większości z wymienionych parametrów otrzymane eksperymentalnie i w symulacjach dynamiki dla uwodnionych warstw podwójnych DMPC, POPC i PEPC porównano w tabelach 1 i 2 oraz na rysunkach 2 i 3. Zgodność odpowiadających sobie wartości wskazuje, że układy symulacyjne weryfikują się pozytywnie względem danych doświadczalnych dla wszystkich trzech obszarów błony. Najistotniejszym wynikiem dla tej serii badań było wykazanie, że w obszarze interfazy błona/woda istnieje sieć powiązań między polarnymi głowami fosfolipidów. Ta sieć jest bardziej rozgałęziona w błonie DMPC niż w błonie POPC (rys. 3 a i b) czy PEPC, prawdopodobnie ze względu na mniejsze odległości między cząsteczkami lipidów, jednakże we wszystkich błonach łączy ona 98% cząsteczek.

Wpływ konformacji *trans* wiązania podwójnego na hydrofobowe wnętrze błony jest obecnie analizowany. Dotychczasowe wyniki otrzymane dla interfazy błona/woda nie wykazały różnic w jej organizacji między konformacją *cis* i *trans* łańcucha  $\beta$ .

Tabela 1

Średnie wartości (zakresy) parametrów charakteryzujących błony fosfolipidowe w fazie ciekłokrystalicznej

Błona		Pole powierzchni/PC (Å <sup>2</sup> )	Szerokość błony (Å)	Liczba konformacji <i>gauche</i> /łańcuch	Czas życia konformacji <i>trans</i> (ps)	Czas życia konformacji <i>gauche</i> (ps)
DMPC	SYM	60,2±1	36±1	2,8±0,1	190 (125-245)	54 (39-76)
	EXP	60 (11)	35 (14)	2,6±0,3 (16)	NO	NO
POPC	SYM	64±1	38±1	3,3±0,1	180 (115-250)	60 (38-68)
	EXP	63-66 (12,13)	35-41** (14)	2,4-3,6* (15,16)	NO	NO
PEPC	SYM	64±1	38±1	3,4±0,1	180 (120-220)	61 (38-75)
	EXP	NO	NO	2,4-3,6* (11,12)	NO	NO
DMPC	SYM	58,4±0,6	36±1	2,7±0,1	190 (130-250)	55 (38-69)
-CHOL	EXP	NO	NO	NO	NO	NO

Pole powierzchni przypadające na cząsteczkę PC; szerokość błony zdefiniowaną jako odległość między punktami, w których gęstość elektronowa fazy lipidowej osiąga połowę maksymalnej wartości; liczba konformacji *gauche* w łańcuchu  $\gamma$ ; czas życia konformacji *trans* wyśredniowany po wszystkich konformacjach *trans* w łańcuchu  $\gamma$ ; czas życia konformacji *gauche* wyśredniowany po wszystkich konformacjach *gauche* w łańcuchu  $\gamma$ , otrzymane eksperymentalnie (EXP) i w opisanych w pracy układach symulacyjnych (SYM).

NO – nie oznaczono; \* wartości uzyskane dla łańcucha  $\gamma$  DPPC; \*\* wartości uzyskane dla błon DMPC i SOPC.

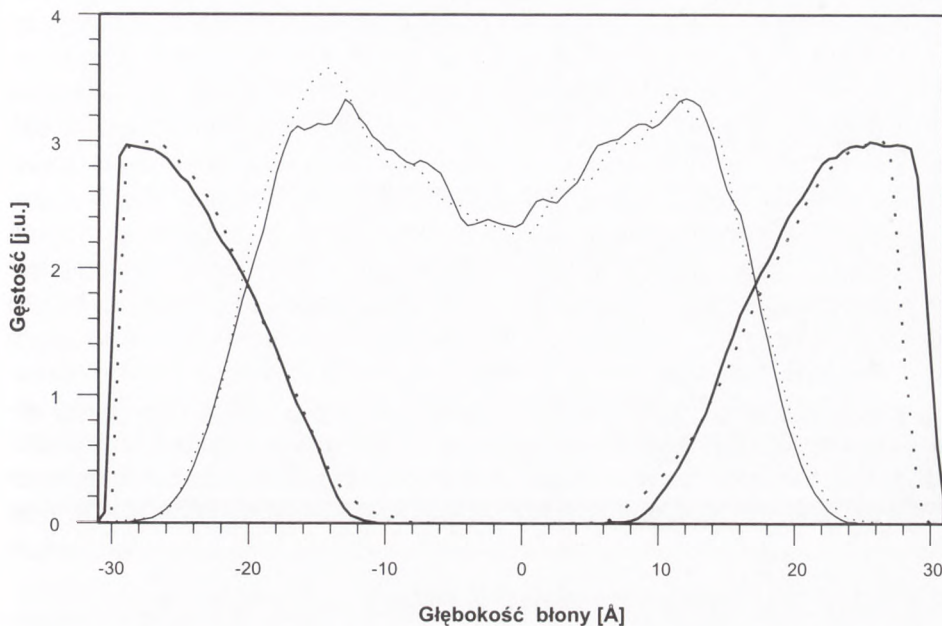
Tabela 2

Średnie wartości parametrów charakteryzujących interfaż błona/woda w błonach fosfolipidowych w fazie ciekłokrystalicznej

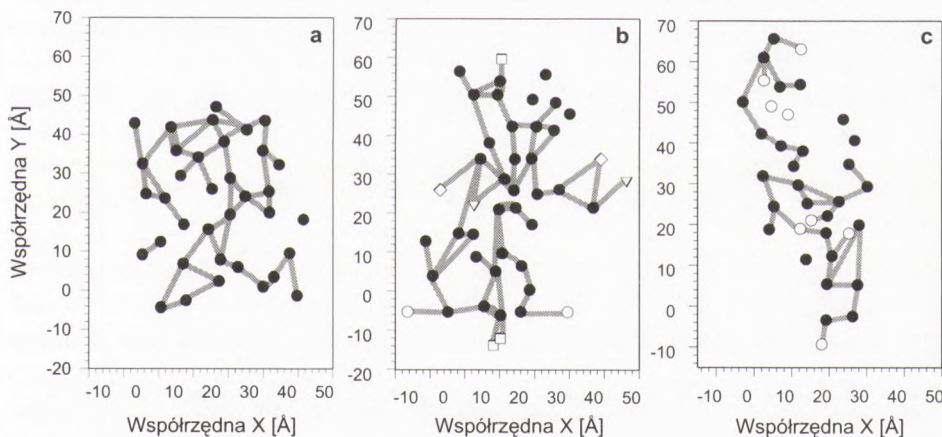
Błona		#w.w. woda/PC	#klatr. woda/PC	#związ. woda/PC	#p.w./PC	#p.l./PC	#p.cz./PC
DMPC	SYM	4,5	6,1	10,6	0,71	2,0	2,7
	EXP	5 (17)	NO	11 (18)	NO	NO	NO
POPC	SYM	5,0	6,6	11,6	0,52	1,6	2,4
	EXP	NO	NO	NO	NO	NO	NO
PEPC	SYM	5,0	6,6	11,6	0,53	1,7	2,3
	EXP	NO	NO	NO	NO	NO	NO
DMPC	SYM	5,2	6,5	11,7	0,59	1,6	2,5
-CHOL	EXP	NO	NO	NO	NO	NO	NO

Liczba związanych wodorowo cząsteczek wody przypadających na fosfolipid (#w.w. woda/PC), liczba cząsteczek wody w klatracie wokół grupy cholinowej (#klatr. woda/PC), liczba cząsteczek wody związa-

nych z cząsteczką fosfolipidu (#związ. woda/PC) oraz liczby przypadających na fosfolipid: pomostów wodnych (#p.w./PC), par ładunkowych (#p.ł./PC); cząsteczek fosfolipidów połączonych poprzez pomosty wodne i pary ładunkowe (#p.cz./PC), otrzymane eksperymentalnie (EXP) i w opisanych w pracy układach symulacyjnych (SYM). NO – nie oznaczono.



Rys. 2. Profil gęstości atomowej błony (cieńsza linia) oraz wody (grubsza linia) wzdłuż normalnej do powierzchni w błonie DMPC (ciągła linia) oraz DMPC-CHOL (przerywana linia).



Rys. 3. Schemat połączeń międzylipidowych poprzez pomosty wodne i pary ładunkowe w błonach a – POPC, b – DMPC i c – DMPC-CHOL. Puste symbole na rysunku b obrazują połączenia między sąsiadującymi pudełkami symulacyjnymi poprzez warunki periodyczności, a na rysunku c przedstawiają cząsteczki cholesterolu.

### 3. Uwodnione dwuwarstwy lipidowe zawierające cholesterol

W błonach plazmatycznych komórek zwierzęcych cholesterol stanowi do 50% wszystkich lipidów błonowych (19). Jego rolą jest: 1) zapewnienie błonie płynności właściwej dla jej funkcji biologicznych (20); 2) obniżenie przepuszczalności (biernego transportu) błony dla wody i związków drobnocząsteczkowych (21); 3) zwiększenie odporności mechanicznej i elastyczności błony (22). Ze względu na ważną biologiczną rolę cholesterolu w błonach oraz trudności w wyjaśnieniu molekularnych mechanizmów działania cholesterolu na podstawie wyników badań eksperymentalnych, podjęto badania oddziaływania cholesterolu z błonami fosfolipidowymi metodami modelowania molekularnego. Do badań użyto trzech wymienionych w poprzednim rozdziale modeli błonowych (błon DMPC, POPC i PEPC), w których 16 cząsteczek PC zamieniono na 16 cząsteczek cholesterolu. Otrzymano 3 modele błony fosfolipidowo-cholesterolowej (PC-CHOL) zbudowane z 56 cząsteczek PC i 16 cząsteczek cholesterolu, w których cholesterol stanowił 22 mol%. Do analiz użyto również błony zbudowanej z 56 cząsteczek DMPC oraz 16 cząsteczek  $\alpha$ -OH-cholesterolu (epicholesterolu) (DMPC-EPICHOL). Epicholesterol jest biologicznie mniej aktywną, izomeryczną formą  $\beta$ -OH-cholesterolu (cholesterolu). Zbadanie błony DMPC-EPICHOL może pomóc w wyjaśnieniu podstawowych mechanizmów błonowych funkcji cholesterolu. Szczegółowy opis budowy modelu błony DMPC-CHOL oraz prowadzonych symulacji podano w pracy (23), pozostałe układy opisane zostały w (24).

Wyniki przeprowadzonych analiz układów symulacyjnych są w zgodzie z wielością wyników eksperymentalnych (23). Potwierdziły między innymi, że penetracja cząsteczek wody hydrofobowego obszaru błony zmniejsza się w obecności cholesterolu (rys. 2). Ze względu na wieloskładnikowość i dynamiczny charakter, interfeza błona/woda jest obszarem bardzo trudnym do prowadzenia badań eksperymentalnych. Dlatego w badaniach symulacyjnych szczególną uwagę zwracamy na ten obszar. W analizach błony DMPC-CHOL wykazano, że cholesterol nie tylko nie niszczy sieci powiązań między polarnymi głowami fosfolipidów w obszarze interfezy błona/woda, ale polarna grupa hydroksylowa (OH) cholesterolu uczestniczy w jej tworzeniu. Jednakże, podobnie jak w błonie POPC i PEPC, sieć międzylipidowych powiązań utworzonych w błonie DMPC-CHOL jest mniej rozgałęziona niż w błonie DMPC, ponieważ cholesterol często „ucina” gałąź sieci (rys. 3 c). Efekt ten jest silniejszy w błonie DMPC-EPICHOL. W obszarze interfezy, grupa OH cholesterolu oddziałuje z głowami polarnymi DMPC poprzez bezpośrednie wiązania wodorowe (16% cząsteczek cholesterolu), pomosty wodne (33% cząsteczek cholesterolu) i pary ładunkowe (34% cząsteczek cholesterolu). W błonie DMPC-EPICHOL, liczba bezpośrednich wiązań wodorowych między DMPC a grupą OH epicholesterolu jest około dwukrotnie większa, a liczba par ładunkowych około dwukrotnie mniejsza niż między DMPC a grupą OH cholesterolu w błonie DMPC-CHOL.

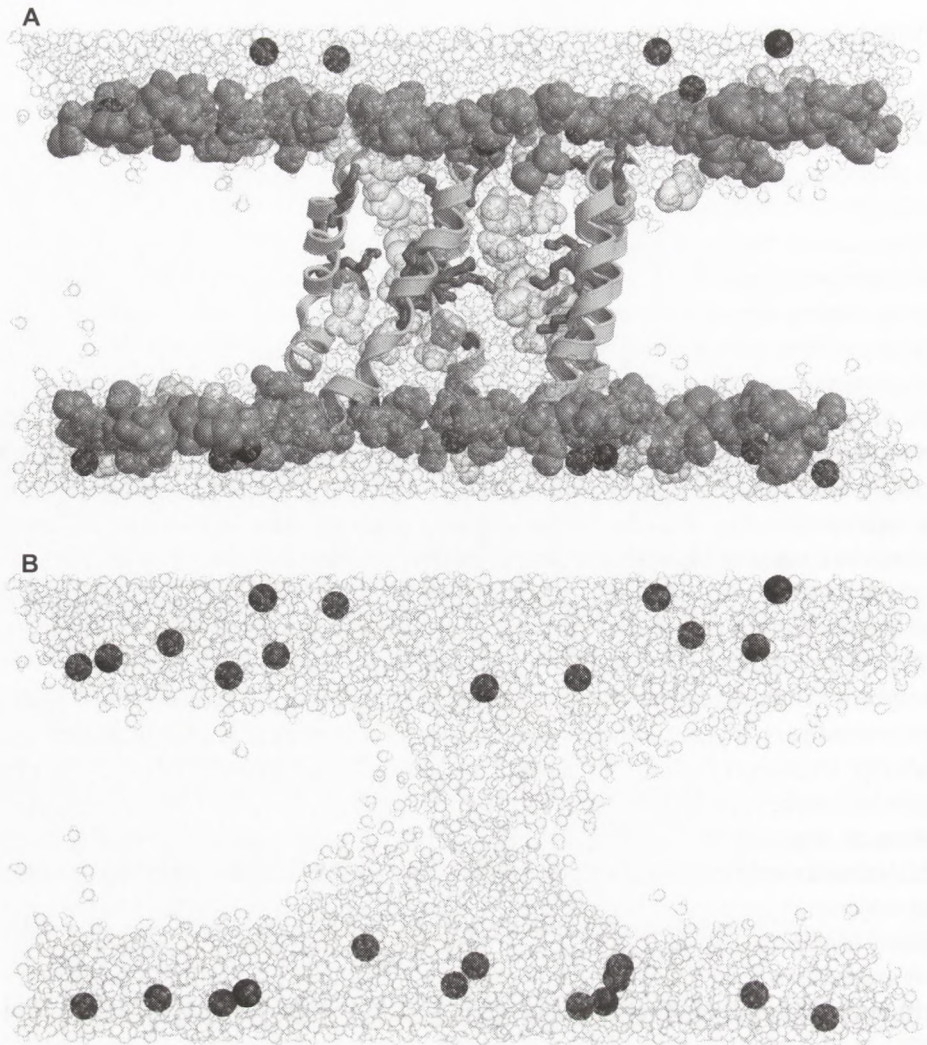


#### 4. Oddziaływania peptydu z błoną zwierzęcą i błoną bakteryjną

Ta część badań nad błonami ma na celu wyjaśnienie molekularnych podstaw biologicznego działania i selektywności magaininy-2 (M2). M2 jest naturalnym peptydem zbudowanym z 23 reszt aminokwasowych, o działaniu antybakteryjnym i antygrzybiczym. W środowisku błony, M2 przyjmuje strukturę amfipatycznej  $\alpha$ -helisy. Amfipatyczność helisy (moment hydrofobowy) wynika ze zlokalizowania polarnych reszt lizynowych po jednej, a niepolarnych reszt fenyloalaninowych po drugiej stronie płaszczyzny przechodzącej przez długą oś helisy; jej całkowity ładunek elektrostatyczny w warunkach fizjologicznych wynosi +4 e. Obecnie przypuszcza się, że cytotoksyczne działanie M2 polega na zaburzeniu struktury błony komórkowej (25), które prowadzi do jej niekontrolowanej przepuszczalności. Selektywność magaininy w stosunku do komórek bakteryjnych wiąże się natomiast z różnicą w składzie lipidowym błon komórek prokariotycznych i eukariotycznych (26). Zgodnie z hipotezą zaproponowaną na podstawie wyników badań eksperymentalnych (27) magainina tworzy pory w błonach komórek bakterii w wyniku oddziaływań elektrostatycznych z ujemnie naładowanymi lipidami obecnymi w tych błonach. Oddziaływaniami elektrostatycznym sprzyja rozkład i wzajemna orientacja hydrofobowych i hydrofilowych reszt aminokwasowych peptydu (28,29). Ponieważ błony komórek eukariotycznych utworzone są głównie z lipidów obojętnych, oddziaływania elektrostatyczne między magaininą i lipidami mają niewielkie znaczenie i magaininy nie wywierają istotnego wpływu na błony komórek eukariotycznych. Na selektywność magaininy może mieć również wpływ cholesterol (28), który często występuje w błonach organizmów zwierzęcych (30), a znacznie rzadziej w błonach bakteryjnych. Jednakże selektywność i mechanizm działania magaininy-2 nadal nie są satysfakcjonująco wyjaśnione, ponieważ interpretacja wyników eksperymentalnych jest trudna i niejednoznaczna.

W celu sprawdzenia hipotez eksperymentalnych zbudowano szereg komputerowych modeli błon. Za model błony zwierzęcej przyjęto posiadaną już błonę POPC-CHOL. Model błony bakteryjnej zbudowano z cząsteczek palmitynowo-oleinowej fosfatydyloetanolaminy (POPE) i palmitynowo-oleinowego fosfatydyloglicerolu (POPG) zgodnie ze stosunkiem molowym oraz symetrią rozkładu lipidów w błonach bakteryjnych (31). Zatem układ symulacyjny składał się z 72 cząsteczek fosfolipidów, z czego 54 (75%) stanowiło POPE, a 18 (25%) POPG, 1955 cząsteczek wody oraz, dla zneutralizowania ujemnego ładunku cząsteczek POPG, 18 jonów  $\text{Na}^+$ . Szczegóły dotyczące budowy błony bakteryjnej opisano w pracy (32).

Metodą symulacji dynamiki molekularnej, ze względu na wciąż ograniczony potencjał obliczeniowy dostępnych komputerów, nie można prześledzić całego procesu perforacji błony bakteryjnej, można natomiast prześledzić wczesne etapy oddziaływania M2 z błoną bakteryjną i zwierzęcą, w których peptyd umieszczony jest w obszarze interfazy błona/woda, równoległe do powierzchni błony. Założyliśmy również, że możliwe będzie prześledzenie końcowego etapu oddziaływania M2



Rys. 4. Widok z boku na układ pora utworzonego przez cząsteczki magaininy-2 i lipidy. Dla przejrzystości rysunku w cząsteczkach lipidów usunięte zostały łańcuchy węglowodorowe. A – głowy polarne fosfatydyloetanolaminy (CPK, ciemnoszary), głowy polarne fosfatydyloglicerolu (CPK, jasnoszary), cząsteczki magaininy-2 (wstęga, jasnoszary), reszty lizyny w cząsteczkach magaininy-2 (kijki, ciemnoszary), jony sodu (CPK, czarny) oraz woda. B – cząsteczki wody oraz jony sodu (CPK, czarny) w układzie pora, po usunięciu wszystkich cząsteczek fosfolipidów i magaininy-2.

z błoną bakteryjną, w którym pięć cząsteczek magaininy oraz 20 silnie oddziaływających z nimi cząsteczek POPG, tworzy por. Cząsteczki M2 ułożone są wtedy prostopadłe do powierzchni błony.

W celu porównania wczesnych etapów oddziaływania M2 z błoną bakteryjną i zwierzęcą, w obszarze interfazy błona/woda zarówno błony zwierzęcej, jak i bak-

teryjnej ułożone zostały 2 cząsteczki peptydu osiami helis równoległe do siebie. Błony poddano 5 ns symulacjom dynamiki molekularnej, otrzymane trajektorie są obecnie analizowane. Wstępne wyniki analiz wskazują, że układy są stabilne.

W celu sprawdzenia hipotezy antybakteryjnego działania magaininy-2, sugerującej tworzenie się supramolekularnej struktury jaką jest por magaininowo-lipidowy, zbudowano układ błony bakteryjnej z porami (rys. 4). W skład tego układu wchodziło 138 cząsteczek POPE, 46 cząsteczek POPG, 5 cząsteczek M2, 5909 cząsteczek wody i 26 jonów  $\text{Na}^+$ . Osie helis magaininy-2 ustawiono równoległe do siebie. Układ poddano symulacji dynamiki molekularnej. Po 2,5 ns, układ pora jest stabilny. W badaniach tych zakładamy, że uzyskanie stabilnej w nanosekundowej skali czasowej supramolekularnej struktury pora będzie pozytywną weryfikacją zaproponowanej hipotezy eksperymentalnej (27). Dokładna analiza oddziaływań międzycząsteczkowych pozwoli na wskazanie molekularnych mechanizmów antybakteryjnego działania i selektywności magaininy-2.

## 5. Oddziaływanie integralnego białka błonowego z błoną fosfolipidową

W celu zbadania mechanizmu przenoszenia sygnału od liganda do białka G przez receptor wazopresyny (V2R), przeprowadzono symulacje dynamiki molekularnej błony DMPC z 1) receptorem z zadokowanym ligandem, którym jest wazopresyna (AVP) oraz 2) „pustym” receptorem, w którym miejsce wiązania liganda wypełnione było 10 cząsteczkami wody. W obu modelach, błona utworzona była z 82 cząsteczek DMPC i uwodniona ponad 5500 cząsteczkami wody. V2R należy do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR) i posiada typowe cechy strukturalne białek tej rodziny, tj. 7 transbłonowych (TM) helis połączonych 6 pętlami (33). Przestrzenna struktura V2R z rozdzielczością atomową dotąd nie została wyznaczona metodami eksperymentalnymi. Jednakże, na podstawie znajomości sekwencji oraz homologii z rodopsyną, której struktura niskiej rozdzielczości (9 Å) została oznaczona metodą kriomikroskopii elektronowej (34), wyznaczono trójwymiarową strukturę V2R na podstawie metody modelowania molekularnego. Szczegóły metodyczne i strukturalne opisane są w pracy (35). Ta struktura stanowiła punkt wyjścia do budowy białkowo-błonowych modeli komputerowych, które poddano 3 ns symulacjom dynamiki molekularnej (36,37).

W przeprowadzonej analizie trajektorii obu symulacji wykazano, że zgodnie z sugestiami eksperymentalnymi, osie transbłonowych helis V2R, zarówno z zadokowanym AVP (V2R/AVP), jak i pustego, niewiele zmieniły swoje położenia względem położenia początkowych. Istnieją jednak różnice w orientacjach i położeniach zagięć w helisach V2R/AVP oraz pustego V2R. Te różnice powodują, że w V2R/AVP tworzy się sieć stykających się z sobą polarnych reszt aminokwasowych, która łączy miejsce wiązania liganda z cytozoolową częścią receptora, a w pustym receptorze ta sieć jest przerwana. Istotnym elementem różnicy między obiema formami receptora

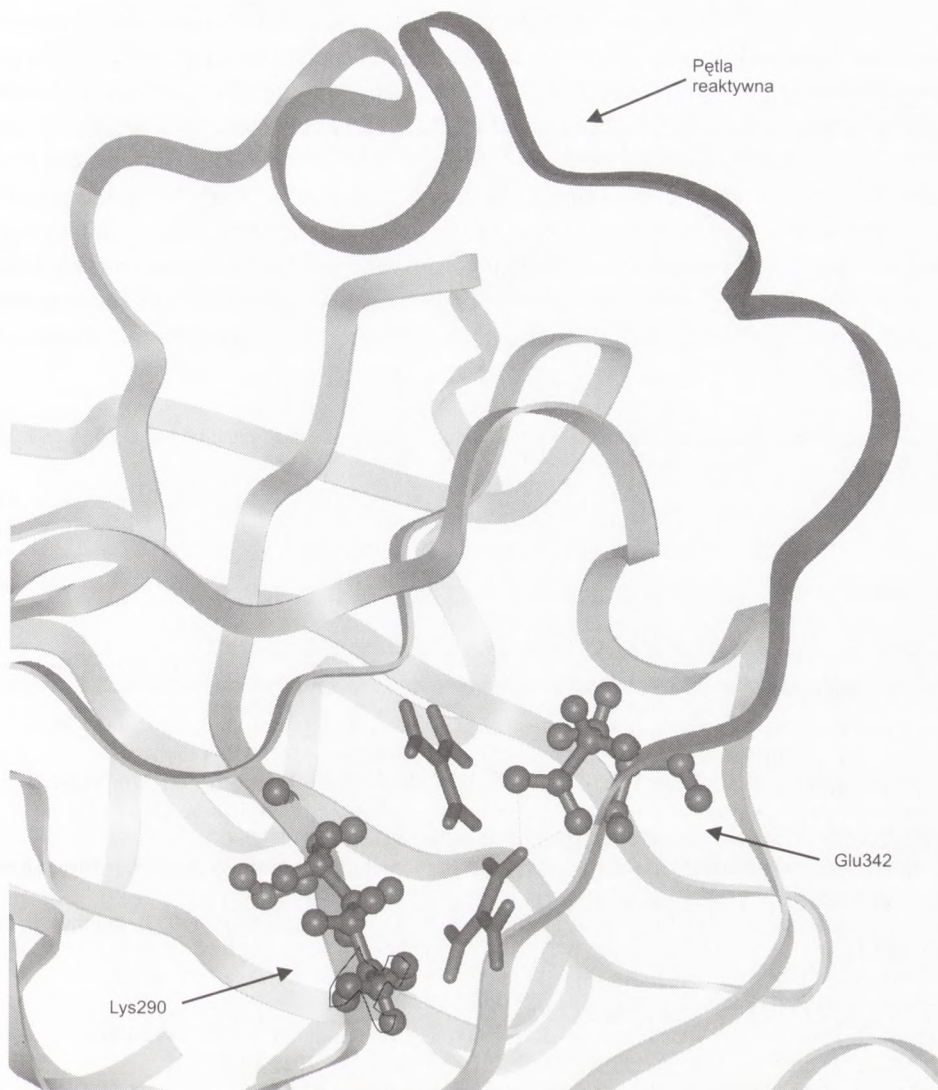
jest kontakt lub jego brak między resztą treoniny 134 TM3 i tyrozyny 325 TM7. W V2R/AVP kontakt ten jest obecny, natomiast w pustym V2R nie występuje. Obie wymienione reszty są konserwatywne w całej rodzinie białek GPCR. Wymieniony kontakt może odgrywać zasadniczą rolę w mechanizmie transdukcji sygnału w białkach receptorowych rodziny GPCR.

## 6. Struktura i dynamika $\alpha_1$ -antytrypsyny

W momencie rozpoczęcia badań nad  $\alpha_1$ -antytrypsyną, znana była jedynie struktura przestrzenna formy ciętej (2), w której zerwane jest wiązanie peptydowe w centrum inhibicji. Strukturę tę użyto do zbudowania modelu komputerowego formy natywnej. Szczegóły dotyczące budowy pętli reaktywnej oraz przeprowadzonych symulacji dynamiki molekularnej opisane są w pracy (38). Otrzymana w drodze modelowania molekularnego struktura wykazywała duże podobieństwo do rozwiązanych później struktur krystalicznych zmutowanych form natywnej  $\alpha_1$ -antytrypsyny (39,40). Na podstawie wyników symulacji wskazano na występowanie kilku wiązań wodorowych stabilizujących pętlę reaktywną oraz pokazano, że widoczny w strukturze krystalicznej mostek solny między Glu342 a Lys290 wspomagany jest przez wiązanie wodorowe.

Do otrzymanej struktury natywnej  $\alpha_1$ -antytrypsyny dodano wodę oraz jony guanidynowe i przeprowadzono 300 ps symulację dynamiki molekularnej układu. Szczegóły tej części badań opisane są w pracy (38). Na podstawie analizy mikrootoczenia Glu342 i Lys290 wykazano utworzenie trwałego wiązania wodorowego między grupą karboksylową Glu342 i dwoma jonami guanidynowymi (rys. 5). Spowodowało to rozbitcie wiązania wodorowego między Glu342 i Lys290, w konsekwencji czego sztywna pętla reaktywna stała się mobilna i wystąpiły w niej zmiany konformacyjne. W przeprowadzonych badaniach modelowych potwierdzono hipotezy eksperymentalne, a także na ich podstawie zaproponowano mechanizmy molekularne odpowiedzialne za tworzenie dimerów  $\alpha_1$ -antytrypsyny w obecności jonów guanidynowych.

Do dalszych badań użyto dzikiego typu i mutantu Z  $\alpha_1$ -antytrypsyny, zbudowanych na podstawie opublikowanych struktur krystalicznych dwóch mutantów  $\alpha_1$ -antytrypsyny (39,40). Otrzymane wyniki wskazują na względnie dużą rozbieżność strukturalną zarówno w obszarze Lys290, jak i w rejonie pętli reaktywnej, wynikającą z braku trwałego oddziaływania między resztami Lys342 i Lys290 w modelu mutantu Z. Obecnie konstruowany jest model kompleksu  $\alpha_1$ -antytrypsyny z kwasem litocholowym w celu zbadania wpływu ligandów na proces polimeryzacji białka.



Rys. 5. Oddziaływania jonów guanidynowych z Glu342. Jony guanidynowe (projekcja kijków) tworzą wiązania wodorowe z grupą karboksylową Glu342 (projekcja kulek). Pętla reaktywna stanowi ciemny odcinek wstęgi; przebieg pozostałych łańcuchów białkowych przedstawiony jest jasną wstęgą.

## 7. Podsumowanie

Większość opisanych w pracy badań nie została jeszcze ukończona. Niemniej, wszystkie omówione tu modele komputerowe zostały zbudowane i poddane symulacjom dynamiki molekularnej. W ogólnym przypadku, analizy otrzymanych w symulacjach trajektorii dostarczają wyników dostępnych i niedostępnych dla badań eks-

perymentalnych. Te pierwsze służą do weryfikacji modeli komputerowych, pozostałe umożliwiają głębszy wgląd w atomowe podstawy struktury i dynamicznego zachowania modeli. Z omówionych w pracy modeli, jedynie dla prostych układów błonowych (błony fosfatydylocholinowe i fosfatydylocholinowo-cholesterolowe) dostępne są wyniki eksperymentalne umożliwiające ich weryfikacje. Dlatego dla prowadzenia badań modelowych skomplikowanych układów błonowych bardzo istotna była pozytywna weryfikacja stosunkowo prostych modeli. Sankcjonuje ona założenie, że wnioski wysunięte na podstawie obserwacji modeli komputerowych będą w racjonalnym przybliżeniu słuszne dla układów rzeczywistych. Dzięki temu możliwe będzie zaproponowanie molekularnych mechnizmów funkcjonowania badanych bioukładów.

Praca finansowana była z grantów Komitetu Badań Naukowych: 4 P05A 081 14, 6 P04A 057 15, 6 P04A 041 16, oraz 6 P04A 024 17.

## Literatura

1. *Biological Membranes*, (1996), Eds. Merz K., M., Roux B., Birkhauser, Boston.
2. Gettins P. G. W., Patston P. A., Olson S. T., (1996), *Serpins: structure, function and biology*, Springer-Verlag, Heidelberg.
3. Loebermann H., Tokuoaka R., Deisenhofer J., Huber R., (1984), *J. Mol. Biol.*, 177, 531-556.
4. Elliott P. R., Abrahams J. P., Lomas D. A., (1998), *J. Mol. Biol.*, 275, 419-425.
5. Janciauskiene S., Carlemalm E., Eriksson S., (1996), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 376, 415-423.
6. Kołoczek H., Bańbuła A., Salvesen G. S., Potempa J., (1996), *Protein Sci.*, 5, 2226-2235.
7. Kołoczek H., Guz A., Kaszycki P., (1996), *J. Protein Chem.*, 15, 447-454.
8. Pasenkiewicz-Gierula M., Takaoka Y., Miyagawa H., Kitamura K., Kusumi A., (1997), *J. Phys. Chem. A*, 101, 3677-3691.
9. Pasenkiewicz-Gierula M., Takaoka Y., Miyagawa H., Kitamura K., Kusumi A., (1999), *Biophys. J.*, 76, 1228-1240.
10. Murzyn K., Róg T., Pasenkiewicz-Gierula M., (1999), *Curr. Top. Biophys.*, 23, 87-94.
11. Nagle J., (1993), *Biophys. J.*, 64, 1476-1481.
12. Smaby J. M., Momsen M., Brockman H., Brown R., (1997), *Biophys. J.*, 73, 1492-1505.
13. Hyslop P., Morel B., Sauerneber R., (1990), *Biochemistry*, 29, 1025-1038.
14. Rand R., Parsegian V., (1989), *Biochim. Biophys. Acta*, 988, 351-376.
15. Meraldi J. P., Schlitter J., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 183, 193-210.
16. Tuchtenhagen J., Ziegler W., Blume A., (1994), *Eur. Biophys. J.*, 23, 323-335.
17. Borle F., Seelig J., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, 735, 131-136.
18. Volke F., Eisenblattar S., Galle J., Klose G., (1994), *Chem. Phys. Lipids*, 70, 121-131.
19. Sackmann E., (1995), *Structure and Dynamics of Membranes*, Eds. Lipowsky R., Sackmann E., 1-64, Elsevier, Amsterdam.
20. Kusumi A., Tsuda M., Akino T., Ohnishi S., Terayama Y., (1983), *Biochemistry*, 22, 1165-1170.
21. Subczynski W. K., Wisniewska A., Yin J.-J., Hyde J. S., Kusumi A., (1994), *Biochemistry*, 33, 7670-7681.
22. Bloom M., Mouritsen O. G., (1995), *Structure and Dynamics of Membranes*, Eds. Lipowsky R., Sackmann E., 65-95, Elsevier, Amsterdam.
23. Pasenkiewicz-Gierula M., Róg T., Kitamura K., Kusumi A., (2000), *Biophys. J.*, 78, 1376-1389.
24. Róg T., (2000), dysertacja doktorska.
25. Saberwal G., Nagaraj R., (1994), *Biochim. Biophys. Acta*, 1197, 109-131.

26. Matsuzaki K., Harada M., Handa T., Funakoshi S., Fujii N., Yajima H., Miyajima K., (1989), *Biochim. Biophys. Acta*, 981, 130-134.
27. Ludtke S. J., He K., Heller W. T., Harroun T. A., Yang L., Huang H.W., (1996), *Biochemistry*, 35, 13723-13728.
28. Tytler E. M., Anantharamaiah G. M., Walker D. E., Mishra V. K., Palgunachari M. N., Segrest J. P., (1995), *Biochemistry*, 34, 4393-4401.
29. Wieprecht T., Dathe M., Krause E., Bayermann M., Maloy W. L., MacDonald D. L., Bienert M., (1997), *FEBS*, 417, 135-140.
30. Dahl J., (1993), *Subcellular Biochemistry*, vol. 20, Eds. Rottem S., Kahane I., 167-188, Plenum Press, New York.
31. van Klompenburg W., de Kruiff B., (1998), *J. Membr. Biol.*, 162, 1-7.
32. Murzyn K., Pasenkiewicz-Gierula M., (1999), *Acta Biochim. Pol.*, 46, 631-639.
33. Iismaa, T. P., Biden T. J., Shine J., (1995), *G-Protein Coupled Receptors*, Springer-Verlag, Heidelberg.
34. Unger V. M., Schertler G. F. X., (1995), *Biophys. J.*, 68, 1776-1786.
35. Czaplewski C., Kaźmierkiewicz R., Ciarkowski J., (1998), *J. Comp-Aided Mol. Design*, 12, 275-287.
36. Czaplewski C., Pasenkiewicz-Gierula M., Ciarkowski J., (1999), *J. Rec. Signal Transduction Res.*, 19, 355-367.
37. Czaplewski C., Pasenkiewicz-Gierula M., Ciarkowski J., (1999), *Int. J. Quantum Chem.*, 73, 61-70.
38. Kołoczek H., Jezierski G., Pasenkiewicz-Gierula M., (1996), *Acta Biochim. Pol.*, 43, 467-474.
39. Song H. K., Lee K. N., Kwon K. S., Yu M. H., Suh S. W., (1995), *FEBS Lett.*, 377, 150-154.
40. Elliott P. R., Lomas D. A., Carrell R. W., Abrahams J. P., (1996), *Nat. Struct. Biol.*, 3, 676-681.