

MARTA PASENKIEWICZ-GIERULA

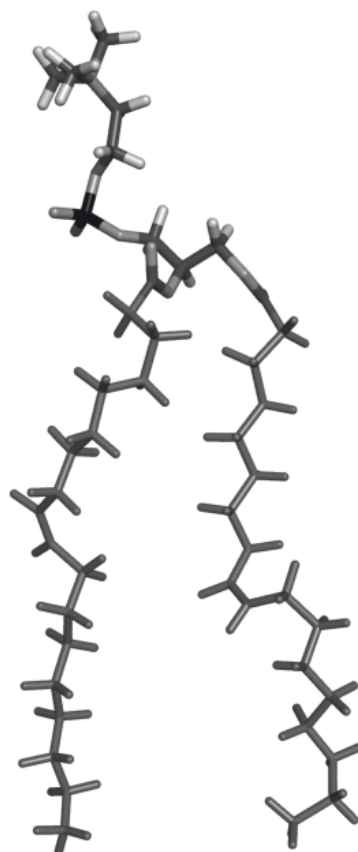
*Zakład Biofizyki Obliczeniowej i Bioinformatyki
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 7, 30-387 Kraków
E-mail: mpg@mol.uj.edu.pl*

BADANIA UKŁADÓW BŁONOWYCH METODAMI MODELOWANIA MOLEKULARNEGO

WSTĘP

Błony biologiczne pełnią ważne i różnorodne funkcje w żywych organizmach. Ich podstawową i najwcześniej rozpoznaną rolą jest odgródnienie komórki (w przypadku błon plazmatycznych) lub organelli komórkowych (w przypadku błon wewnętrznych) od otoczenia i zapewnienie im integralności. Błony plazmatyczne służą jako selektywne bariery kontrolujące i regulujące skład wewnątrzkomórkowy oraz pośredniczą we wzajemnym oddziaływaniu pomiędzy komórką i jej otoczeniem umożliwiając odbieranie i przekazywanie sygnałów niezbędnych dla funkcjonowania komórki.

Głównym elementem strukturalnym błony biologicznej jest matryca lipidowa, najczęściej w formie ciekłokrystalicznej dwuwarstwy (warstwy podwójnej), zbudowana z różnych typów lipidów, których głowy polarne (Ryc. 1) należą do kilku klas chemicznych. W błonach komórek zwierzęcych występują głównie fosfolipidy: sfingolipidy (SM), glicerolipidy (fosfatydylocholiny (PC), fosfatydyloetanolaminy (PE), fosfatydyloseryny (PS)) oraz sterydy, przede wszystkim cholesterol (Chol). Błony różnych typów komórek, w obrębie jednego organizmu, charakteryzują się swoistym składem lipidowym. Z kolei błony plazmatyczne komórek bakteryjnych zbudowane są głównie z PE, fosfatydylogliceroli (PG) i lipopolisacharydów (LPS). Trwałość i integralność matrycy lipidowej zapewniają słabe oddziaływania (nie-kowalencyjne) między cząsteczkami lipidów z dużym udziałem cząsteczek wody. Stan ciekłokrystaliczny ma-



Ryc. 1. Cząsteczka fosfatydylocholiny (PC) „wyjęta” z dwuwarstwy lipidowej w fazie ciekłokrystalicznej.

Głowa polarna jest narysowana grubszą linią, jasnym kolorem oznaczone są atomy wodoru. Łańcuchy węglowodorowe są narysowane cieńszą linią.

trycy charakteryzuje się niskim uporządkowaniem łańcuchów węglowodorowych, szybkimi ruchami rotacyjnymi fragmentów oraz ruchliwością translacyjną cząsteczek lipidów.

Ogólnie przyjęty model błony biologicznej został zaproponowany przez SINGERA i NICOLSONA (1972). W modelu tym, nazwanym modelem płynnej mozaiki, matryca lipidowa jest pasywnym „rozpuszczalnikiem” dla białek. Takiemu postrzeganiu matrycy przeczy jednak mnogość typów lipidów błonowych (~200), jak i najnowsze badania wskazujące, że lipidy aktywnie uczestniczą w funkcjonowaniu białek błonowych. Wykazano, że aktywność takich białek jak pompa wapniowo-potasowa czy liczne ATP-azy (DING i współaut. 1994) istotnie zależy od składu lipidowego błony. Wiele białek błonowych wymaga też obecności w błonie cholesterolu. Cholesterol może tam pełnić podwójną rolę, jako kofaktor enzymu lub jako regulator płynności błony. Jego obecność decyduje o tym, czy pewne białka wbudują się do błony, czy też pozostaną w roztworze (TAYLOR i ROSEMAN 1996). Błona lipidowa może przyjmować różne fazy zależnie od rodzaju cząsteczek lipidów, stężenia wody oraz temperatury (fazy liotropowe) oraz wykazywać polimorfizm (SEDDON i TEMPLER 1995). Fazy liotropowe układów lipidowych przyjmują różne struktury przestrzenne o różnej trwałości (SEDDON i TEMPLER 1995) – najtrwalsze są fazy lamelarne i heksagonalne; te ostatnie są strukturami rurkopodobnymi. Odwrócona faza heksagonalna tworzy się, gdy stosunek liczby cząsteczek lipidów do wody jest duży. Wykazano, że faza liotropowa matrycy ma również wpływ na aktywność białek. Na przykład błonowy enzym deepoksydaza wiolaksantynowa wykazuje aktywność katalityczną, gdy matryca przyjmuje lokalnie odwróconą fazę heksagonalną (GOSS i współaut. 2005). Wiele innych białek, do prawidłowego funkcjonowania potrzebuje w najbliższym otoczeniu lipidów, które mają tendencję do spontanicznego tworzenia fazy nie-lamelarnej (VAN DEN BRINK i współaut. 2004). Autorzy cytowanej pracy nie byli w stanie wykazać, że te lipidy indukują w błonie plazmatycznej miejscowo nielamelarne fazy, ale wykazali, że sama ich obecność wywołuje lokalny stres i powoduje zmianę profilu ciśnienia lateralnego w poprzek błony, co wpływa na funkcjonowanie białek.

Również aktywność peptydów antybakteryjnych zależy od składu lipidowego błony. Na przykład magaininy, naturalne peptydy

antybakteryjne, działają niszcząco na błony komórek bakteryjnych, a nie na błony komórek zwierzęcych (EPAND i VOGEL 1999). Ta wybiórczość magainin jest związana z różnicą w składzie lipidowym błon komórek eukariotycznych i prokariotycznych. Jak już wspomniano powyżej, błony bakteryjne bogate są w ujemnie naładowane lipidy (LPS i PG) i nie zawierają cholesterolu, podczas gdy błony zwierzęce tworzą głównie lipidy obojętne (PC i SM) i cholesterol.

Pomimo że cząsteczki lipidów mogą w zasadzie swobodnie dyfundować w płaszczynie błony (DAY i KENWORTHY 2009), często nawet dwuskładnikowa błona lipidowa nie jest strukturą jednorodną. Stwierdzono, że pewne typy lipidów ulegają segregacji w płaszczynie błony, tworząc struktury domenowe (PANDIT i SCOTT 2009). Przykładem samorzutnej segregacji lipidów jest tworzenie się „tratw” (ang. rafts), tj. domen bogatych w nasycone PC (lub SM) i Chol w trójskładnikowej błonie lipidowej zawierającej mono-nienasycone PC, nasycone PC (lub SM) i Chol (BERKOWITZ 2009). Na podstawie badań eksperymentalnych postuluje się, że w błonach biologicznych tratwy (platformy tratwowe) odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu komórek (SUBCZYNSKI i KUSUMI 2003); są między innymi zaangażowane w procesy transportu i sortowania składników błon wewnątrzkomórkowych, sygnalizacji międzykomórkowej (EDIDIN 2003), a także stanowią specyficzne otoczenie dla szeregu białek błonowych, niezbędne dla ich funkcjonowania np. kinaz tyrozynowych z rodziny src (SIMONS i TOOMRE 2000).

Ze względu na wielką złożoność strukturalną, fazową i dynamiczną błon biologicznych, eksperymentalne badania ich biofizycznych własności są trudne. Dlatego najczęściej prowadzi się je na układach modelowych. Doświadczalnymi modelami błon biologicznych są zazwyczaj warstwy (lub wielowarstwy) podwójne utworzone z jednego lub kilku typów lipidów, czasem zawierające też kontrolowaną ilość innych składników (błony modelowe). Te modele są w zasadzie odpowiednikami matrycy lipidowej błony. Najczęściej używanymi technikami w tych badaniach są magnetyczny rezonans jądrowy (NMR), elektronowy rezonans paramagnetyczny (ESR), krystalografia rentgenowska (X-ray), rozproszenie neutronowe oraz metody fluorescencyjne. Metody te wykazały wiele ciekawych własności błon modelowych, jednakże – ze względu na ograniczoną rozdziel-

czość czasowo-przestrzenną – nie są one w stanie wyjaśnić podstawowych mechanizmów (na poziomie atomowym), rządzących zachowaniem błony. Bez wyjaśnienia tych mechanizmów całkowite zrozumienie sposobów funkcjonowania błony nie jest możliwe.

Klasyczna symulacja dynamiki molekularnej (ang. molecular dynamics simulation) na poziomie atomowym jest szeroko stosowaną metodą obliczeniową przewidywania struktury i badania dynamiki makrocząsteczek oraz układów molekularnych (LEACH 2001). Bazuje ona na założeniu, że atomy w cząsteczce są obiektami klasycznymi podlegającymi dynamice newtonowskiej. Stąd, oraz ze znajomości oddziaływań międzyatomowych, znamy położenie każdego atomu w układzie w dowolnej chwili symulacji (jednakże w ograniczonej skali czasowej); znana jest więc struktura i zachowanie dynamiczne całego układu. Rozdzielczość atomowa oraz możliwość bezpośredniego śledzenia procesów w skali czasowej od femtosekund do setek nanosekund (górną granicę skali zależy od możliwości obliczeniowych komputera) stanowią, iż metoda symulacji dynamiki molekularnej w niektórych przypadkach góruje nad metodami eksperymentalnymi, a generalnie jest ich istotnym uzupełnieniem.

Metoda symulacji dynamiki molekularnej jest szczególnie odpowiednia do badania błon, których istotną cechą jest tzw. struktura dynamiczna, co znaczy, że zachodzą w niej szybkie zamiany położeń atomów w wyniku przejść konformacyjnych (izomeryzacji *trans-*

gauche w łańcuchach węglowodorowych) i dyfuzji, przy zachowaniu średnich parametrów strukturalnych układu. Stosowanie symulacji dynamiki molekularnej do badania błon napotyka na wiele trudności, są one jednak inne niż w przypadku białek. Pierwszą trudnością jest wybór struktury początkowej komputerowego modelu błony. Dla białek, jest to najczęściej uporządkowana struktura z bazy struktur białkowych PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) bliska globalnemu minimum energii potencjalnej. Wygenerowana w symulacjach struktura dynamiczna białka niewiele odbiega od jego struktury początkowej. Natomiast matryca lipidowa błony w warunkach fizjologicznych jest w stanie ciekłokrystalicznym, który „oddalony” jest od stanu uporządkowanego (krystalicznego) o dwa przejścia fazowe. Często przy budowie modelu błony z konieczności używa się jednak uporządkowanej struktury lipidów jako początkowej. Następną trudnością jest czas symulacji; w odróżnieniu od białka, błona jest układem wielcząsteczkowym i dynamicznym i dlatego, dla osiągnięcia stanu równowagi termicznej symulacje dynamiki błony muszą być prowadzone w znacznie dłuższej skali czasowej, niż w przypadku białek. Odrębny problem stanowi hydratacja błony; warunkiem istnienia ciekłokrystalicznej fazy lamelarnej jest tzw. pełne uwodnienie błony, kiedy na jedną cząsteczkę lipidu przypada około 30 cząsteczek wody. Tę wodę należy jawnie uwzględnić w modelu, co powoduje, że układ, który poddajemy symulacji jest bardzo duży.

MODEL KOMPUTEROWY BŁONY LIPIDOWEJ

W klasycznym modelowaniu molekularnym, model komputerowy układu cząsteczkowego wymaga dwóch podstawowych definicji: początkowego przestrzennego położenia atomów, z których zbudowane są cząsteczki tworzące układ (początkowej struktury przestrzennej) oraz oddziaływań międzyatomowych. O problemie początkowej struktury przestrzennej lipidów błonowych była mowa powyżej. Rozwiązanie jest dwojakie: albo korzysta się z kilku gotowych, dostępnych w Internecie ciekłokrystalicznych błon, albo tworzy się błonę z lipidów w konformacji o najniższej energii, ale wtedy taką błonę należy „przeprowadzić” przez główne przejście fazowe, tj. z fazy częściowo uporządkowanej do ciekłokrystalicznej. Wymaga to prowadzenia wstępnej symulacji dynamiki molekular-

nej przy wzrastającej temperaturze ale stałym ciśnieniu.

Definicja oddziaływań międzyatomowych (funkcji potencjału) polega na dobraniu odpowiedniej postaci matematycznej dla wybranych przez nas oddziaływań – zazwyczaj są to trzy oddziaływania wiążące odpowiedzialne za zachowanie poprawnych wartości parametrów struktury cząsteczki i dwa niewiążące odpowiedzialne za oddziaływania wewnątrz- i międzycząsteczkowe, a także pewne poprawki. W tym doborze stosujemy zasadę, że oddziaływania w układzie o złożonej strukturze opisujemy najprostszymi funkcjami, ale tak dobranymi, aby model poprawnie reprodukował własności układu rzeczywistego. Jednak nie sama postać funkcyjna oddziaływań, ale parametry tej funkcji, które

zależą od typów atomów, między którymi dane oddziaływanie ma miejsce, stanowią największy problem definicji modelu. Jedyne właściwie dobrane/wyliczone parametry umożliwiają zbudowanie poprawnego modelu komputerowego. Parametryzacja funkcji potencjału lipidów błonowych nie jest zakończonym procesem i nadal przysparza wiele problemów (ANEZO i współaut. 2003). Ta problematyka jest jednak zbyt szczegółowa, żeby ją tu omawiać (SONNE i współaut. 2007). W skali atomowej błona komórkowa jest układem prawie nieskończonym w dwóch wymiarach (otacza komórkę, której średnica jest o ~ 3 rzędy wielkości większa niż grubość błony). Komputerowe modele błony zbudowane są z relatywnie niewielkiej liczby cząsteczek lipidów (100–1000). Aby zapewnić ciągłość („nieskończoność”) układu stosuje się dwu- lub trójwymiarowe periodyczne warunki brzegowe (ang. periodic boundary conditions, PBC). Dwuwymiarowa periodyczność jest odpowiedniejsza do modelowania pojedynczej błony (dwuwarstw), jednakże stosowanie jej nastęrcza trudności techniczne (układ jest „otwarty” wzdłuż osi z). Dlatego zazwyczaj stosuje się trójwymiarowe PBC, co modeluje powszechnie używane w badaniach eksperymentalnych błony wielowarstwowe. Otrzymany układ periodyczny powstaje przez otoczenie podstawowego „pudełka symulacyjnego” jego replikami, więc analizie podlegają jedynie cząsteczki z pudełka podstawowego.

Metoda symulacji dynamiki molekularnej wymaga, oprócz dwóch definicji wymienionych wyżej, wprowadzenia do układu „generatora ruchu”, którym w omawianych modelach jest równanie ruchu opisujące drugą zasadę dynamiki Newtona. Dla każdego atomu, znajdującego się w polu innych oddziałujących z nim atomów, rozwiązywane jest równanie ruchu dające wielkość jego przesunięcia w danym kroku czasowym. Przesunięcie atomu jest efektem działania wypadkowej sił wynikających z oddziaływań międzyatomowych. Krok czasowy jest tak dobrany, by poprawnie „próbkować” każdy ruch w układzie. Dlatego jego wielkość jest narzucona przez

najszybsze ruchy, tj. harmoniczne drgania wiązań kowalencyjnych. Po wprowadzeniu pewnych ograniczeń, krok czasowy wynosi najczęściej 2 fs (EGBERTS i współaut. 1994). Przed rozpoczęciem symulacji, oprócz struktury początkowej układu, musimy określić początkowe prędkości atomów. Można przyjąć, że wszystkie początkowe prędkości są równe zero, lub też losowo przypisać je atomom z rozkładu Maxwella-Boltzmann dla założonej temperatury początkowej układu (zazwyczaj niskiej), przy czym całkowity pęd musi być równy zero. Kolejne, iteracyjne, rozwiązanie równania Newtona dla każdego atomu w kolejnym kroku czasowym generuje zbiór położeń atomów (a także ich prędkości) w funkcji czasu, który nazywamy trajektorią układu. Należy tu podkreślić, że trajektoria zawiera niezwykle szczegółową informację o układzie molekularnym, której nie jesteśmy w stanie otrzymać w badaniach eksperymentalnych, tj., położenie każdego atomu w wieloatomowym układzie praktycznie w dowolnej chwili (co 2 fs). W porównaniu do modelu eksperymentalnego, model komputerowy jest jednak o wiele rzędów wielkości mniejszy – zbudowany jest z kilkudziesięciu tysięcy do miliona atomów. Liczba atomów w układzie stanowi ograniczenie modelu – rzeczywisty czas obliczeń skaluje się jak $N \cdot \log N$, gdzie N jest liczbą atomów występujących jawnie w układzie. Symulacja dynamiki molekularnej generuje model dynamiczny układu molekularnego, który jest w zasadzie wielkim zbiorem liczbowym. Ilościowej informacji o interesującym nas aspekcie zachowania układu dostarcza dopiero odpowiednia analiza statystyczna tego zbioru (trajektorii). Otrzymane w analizach wielkości charakteryzujące układ, czy poszczególne jego fragmenty, można porównać z analogicznymi wielkościami otrzymanymi eksperymentalnie, o ile istnieją – to porównanie pozwala na weryfikację modelu. Pozytywna weryfikacja uwiarygodnia model, którego głównym atutem jest wskazywanie podstawowych mechanizmów na poziomie atomowym, które są odpowiedzialne za obserwowana eksperymentalnie procesy na poziomie molekularnym.

WYNIKI

Omówienie wyników, których dostarczyły badania układów błonowych metodami modelowania molekularnego jest poza możliwościami nawet bardzo obszernego artyku-

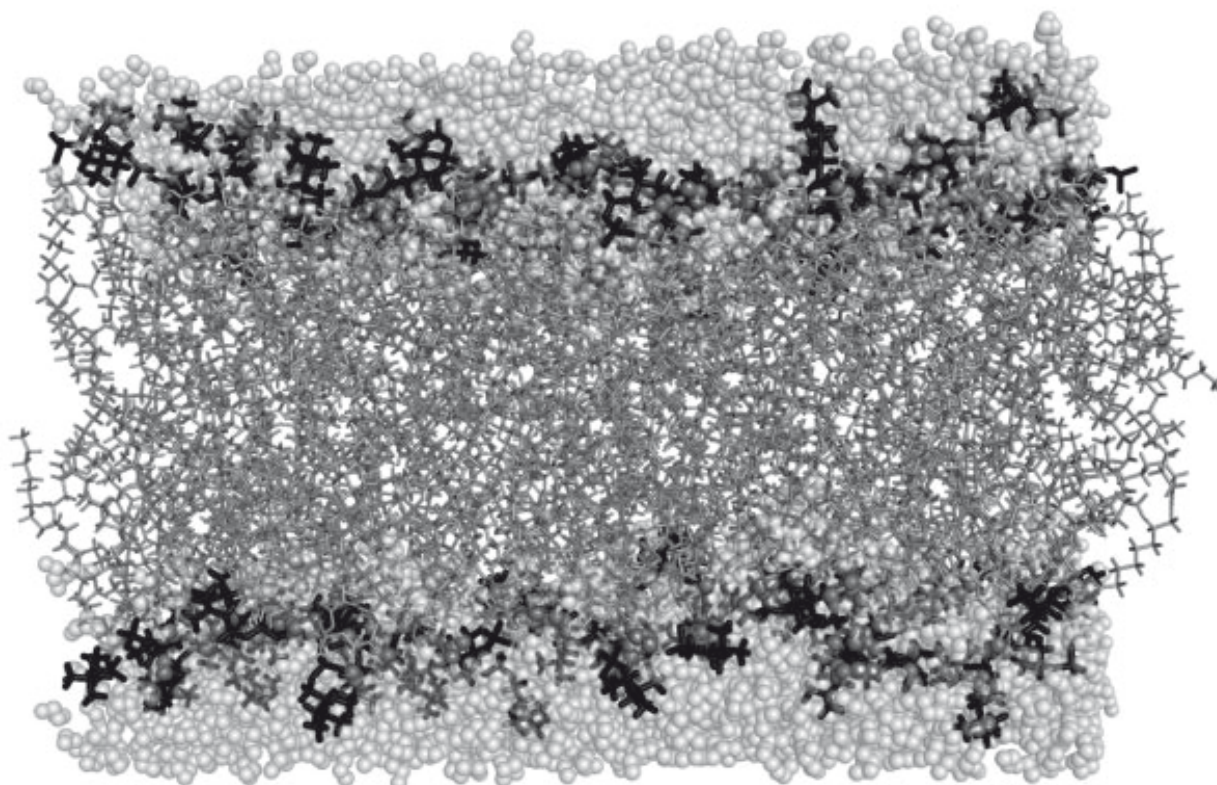
łu. Wiele z tych wyników jest w zgodzie ze znanymi wcześniej wynikami badań doświadczalnych. Jednakże część z nich nie jest możliwa (lub jest bardzo trudna) do otrzymania

w badaniach obecnymi metodami eksperymentalnymi – te wyniki nie były więc wcześniej znane.

Tym wynikiom możemy ufać jedynie wtedy, gdy układ został „pozytywnie zweryfikowany” względem innych dostępnych danych eksperymentalnych lub teoretycznych. Jedne z takich wyników zaprezentuję tutaj. Dotyczą one udziału cząsteczek wody w strukturze błony czysto-lipidowej (bez białek czy peptydów) oraz wpływie błony na własności wody. Woda odgrywa zasadniczą rolę w spontanicznym tworzeniu się dwuwarstwy lipidowej, ale też w utrzymaniu lokalnie odpowiedniej fazy liotropowej błony biologicznej, niezbędnej dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Obszar błony zajmowany zarówno przez głowy polarne lipidów jak i cząsteczki wody nazywany jest interfazą błona-woda. Jak pokazuje rycina 2, woda przenika obszar głów polarnych, jednakże praktycznie nie wnika w hydrofobowy obszar łańcuchów węglowodorowych. Eksperymentalne badania interfazy błona-woda są bardzo trudne i frag-

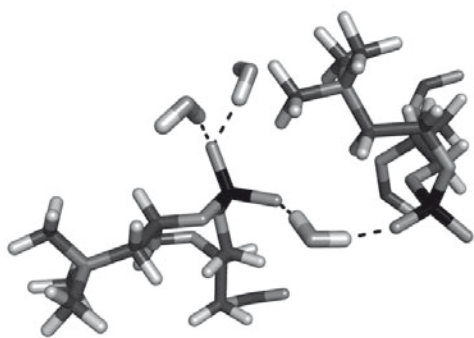
mentaryczne, przede wszystkim ze względu na krótką skalę czasową dynamiki cząsteczek wody oraz oddziaływań lipid-woda, a także liczbę różnych grup chemicznych obecnych w tym obszarze oraz ich dynamikę.

Badania metodami symulacji dynamiki molekularnej uwodnionych błon PC dostarczyły ilościowych wyników dotyczących wiązań wodorowych między cząsteczkami wody i grupami polarnymi PC (przede wszystkim fosforanowymi i karbonyłowymi); w tych wiązaniach (PC...woda), grupy polarne PC są akceptorami, a cząsteczki wody, donorami wiązań wodorowych (PASENKIEWICZ-GIERULA i współaut. 1997). Najwięcej wiązań wodorowych z wodą tworzą „końcowe” atomy tlenu grupy fosforanowej – średnio 2 wiązania/atom tlenu (Ryc. 3), oraz atomy tlenu grup karbonylowych – poniżej 1 wiązania/atom tlenu. Średnio na cząsteczkę PC przypada 5–6 wiązań wodorowych z wodą. Badania eksperymentalne pozwalają jedynie na oszacowanie sumarycznej liczby silnie związanych cząsteczek wody z cząsteczką fosfatydylocho-



Ryc. 2. Dwuwarstwa lipidowa w fazie ciekłokrystalicznej wygenerowana w symulacjach dynamiki molekularnej.

Głowy polarne są reprezentowane przez grubsze czarne linie, łańcuchy węglowodorowe przez cieńsze szare linie, a woda przez jasno-szare kule.



Ryc. 3. Przykłady wiązań wodorowych (linie przerywane) między atomem tlenu grupy fosforanowej fosfolipidu i cząsteczkami wody oraz pomost wodny łączący dwie cząsteczki fosfolipidu – jedna cząsteczka wody jest jednocześnie związana wodorowo z atomami tlenu z dwóch grup fosforanowych.

liny w ciekłokrystalicznej błonie; zależnie od metody, liczba ta wynosi 5 (NAGLE 1993) lub 8 (NAGLE i TRISTRAM-NAGLE 2000). Metodą symulacji dynamiki molekularnej możliwe było wykazanie, że liczba związanych wodorowo cząsteczek wody przez PC jest mniejsza od liczby wiązań wodorowych PC...woda (PASENKIEWICZ-GIERULA i współaut. 1997, 1999). Szczegółowa analiza oraz wizualizacja obszaru interfazy wyraźnie pokazały, że jedna cząsteczka wody może być równocześnie związana wodorowo z dwoma cząsteczkami PC, tworząc tzw. międzycząsteczkowy pomost wodny (PC...woda...PC) (Ryc. 3). Pomosty wodne łączą cząsteczki PC w „dynamiczną sieć”. Znaczący to, że pomosty nieustannie powstają i zanikają, przy zachowaniu średniej ich liczby. W praktyce, co pewien czas każda cząsteczka PC w błonie jest przez chwilę elementem sieci. W tworzeniu sieci uczestniczą też inne słabe oddziaływania, m. in., bardzo liczne oddziaływania między dodatnio naładowaną grupą cholinową jednej cząsteczki PC i ujemnie naładowaną grupą fosforanową lub karbonylową drugiej (pary ładunkowe) (PASENKIEWICZ-GIERULA i współaut. 1999). Pomosty wodne występują w strukturze krystalicznej błony PC (PEARSON i PASCHER 1979), gdzie na cząsteczkę lipidu przypadają 2 cząsteczki wody, a także w strukturach białek; rolą tych wiązań jest stabilizacja struktury przestrzennej. Czasy życia pojedynczych wiązań PC...woda i pomostów PC...woda...PC w błonie ciekłokrystalicznej można pogrupować w cztery klasy, choć elementarnych procesów prowadzących do zaniku tych oddzia-

ływań jest znacznie więcej – każdy z nich może mieć swój charakterystyczny czas, nie mniej należący do jednej z czterech klas. W obrębie każdej klasy, czasy życia PC...woda i PC...woda...PC są bardzo zbliżone, jednak liczebności pojedynczych wiązań i pomostów są różne. W klasie długożyjących oddziaływań, zanikających z czasem ~ 500 ps, liczba pomostów PC...woda...PC jest dwukrotnie większa ($\sim 20\%$ wszystkich pomostów) niż wiązań PC...woda ($\sim 10\%$ wszystkich wiązań), a w klasie, w której oddziaływania zanikają z czasem o rząd wielkości krótszym, ~ 30 ps, zależność jest odwrotna ($\sim 25\%$ pomostów i $\sim 40\%$ wiązań) (RÓG i współaut. 2009). Pomosty wodne są tylko chwilowo trwałe, ale ich liczba jest stała w czasie. Pozwala to przypuszczać, że mają one wpływ na stabilizację struktury błony w stanie ciekłokrystalicznym w podobnym stopniu, jak to ma miejsce w stanie krystalicznym. Stosunkowo krótki czas życia oddziaływań między wodą a PC wynika z dużej ruchliwości cząsteczek wody, która i tak jest spowolniona w pobliżu błony. Najsilniej odczuwa wpływ błony woda z pierwszej warstwy hydratacyjnej; ten wpływ maleje z odległością ale jest nadal znaczny w odległości 7 \AA od powierzchni błony. Stała dyfuzji lateralnej wody z pierwszej warstwy jest ponad 5-krotnie mniejsza niż wody „swobodnej”. Co ciekawe, nie tylko dyfuzja wody w pobliżu, ale też w dalszej odległości od błony jest anizotropowa: jest szybsza równoległe do powierzchni niż do normalnej, podczas gdy dyfuzja wody „swobodnej” jest izotropowa (RÓG i współaut. 2002, MURZYN i współaut. 2006).

Z omówionych powyżej wyników wyraźnie widać, że stabilność aktywnej biologicznie ciekłokrystalicznej lamelarniej matrycy lipidowej wymaga obecności wody; z kolei, matryca ma istotny wpływ na właściwości wody. Nasuwa się jednak pytanie, jak zmieni się wzajemna relacja błona-woda, jeśli za wodę (H_2O) uwadniającą błonę podstawimy wodę ciężką (D_2O). Pytanie to ma znaczenie praktyczne, ponieważ D_2O jest często używanym rozpuszczalnikiem w badaniach eksperymentalnych biocząsteczek i ich układów metodami NMR, rozproszenia neutronowego, spektroskopii w podczerwieni i Ramana. Wyniki badań metodami symulacji dynamiki molekularnej (RÓG i współaut. 2009) pokazują, iż wpływ D_2O na właściwości strukturalne błony jest wyraźny choć stosunkowo niewielki – D_2O powoduje, że błona zmniejsza swoją powierzchnię i staje się bardziej zwarta,

tak jak to obserwowano dla białek (CIONI i STRAMBINI 2002); można więc przypuszczać, że staje się mniej elastyczna. Istotnej zmianie ulegają natomiast procesy zachodzące w czasie, w których uczestniczą cząsteczki D₂O. Chemicznie, woda niewiele się różni od ciężkiej wody, jednakże wiązania wodorowe w czystej D₂O są trwalsze niż w H₂O, efektem tego jest wolniejsza dyfuzja własna D₂O; stałe dyfuzji, wyznaczone eksperymentalnie dla czystej D₂O i H₂O są odpowiednio: 3.54×10⁻⁵ i 4.46×10⁻⁵ cm²/s (WOOLF 1976). Wpływ błony na dyfuzję D₂O jest większy niż na H₂O (RÓG i współaut. 2009); stałe dyfuzji wyznaczone w badaniach symulacyjnych dla D₂O i H₂O są odpowiednio: 1.48×10⁻⁵ i 2.58×10⁻⁵ cm²/s. To większe „spowolnienie” D₂O niż H₂O przez błonę wynika z trwalszych wiązań wodorowych między D₂O a PC. Czasy życia

wiązań PC...D₂O są dwukrotnie dłuższe niż wiązań PC...H₂O; czas życia długożyjącej składowej wynosi ~1 ns. D₂O, podobnie jak H₂O, tworzy pomosty wodne między cząsteczkami PC (PC...D₂O...PC) – ich czasy życia są również około 2-krotnie dłuższe niż w przypadku (PC...H₂O...PC).

Przedstawione wyniki badań interfazy błona-woda metodami modelowania molekularnego wskazują, że ciężka woda ma wpływ na właściwości błony, co oznacza, że badania eksperymentalne układów błonowych i innych układów molekularnych w ciężkiej wodzie mogą dać wyniki różne od otrzymanych dla „zwykłej” wody.

Podziękowania. Składam podziękowanie panu Krzysztofowi Baczyńskiemu za pomoc w przygotowaniu rysunków do pracy.

MOLECULAR MODELING STUDIES OF MEMBRANE SYSTEMS

Summary

Biological membranes enclose every cell (plasma membrane) and some intracellular organelles (internal membranes). The main structural element of a biological membrane is a liquid-crystalline lipid bilayer. Experimental studies of lipid bilayers are difficult to carry out and to interpret because of their structural disorder and superposition of motions occurring in different time scales. Besides, due to limited spatial and time resolutions, they provide only an averaged behaviour of the molecules in the bilayer. Detailed information about the dynamical structure and time scales of events in the membrane can be obtained using molecular dynamics (MD) simulation methods. Although MD simulation is, in principle, characterized by an atomic resolution and time resolution in the femtosecond time scale in principle, the total simulation time is limited at present to several hundred nanoseconds. So, the method allows observation of the processes up to the 10⁻⁷ s time scale.

MD simulation studies of hydrated lipid bilayers have shown that at the membrane/water interface there are numerous but short-lived hydrogen (H-) bonds between lipid headgroups and water molecules as well as an extended network of inter-lipid links *via* water molecules that are simultaneously H-bonded to two lipid molecules, i.e., so called water bridges. Exchange of H₂O by D₂O affects the time-averaged properties of the PC bilayer to some extent. When the bilayer is hydrated by D₂O it becomes more compact than in the case of H₂O. This can be assigned to the more stable H-bonds between PC and D₂O than H₂O and, particularly, to the more stable network of D₂O water bridges compared with the H₂O ones. In effect, the self-diffusion coefficient of D₂O averaged over all water molecules in the bilayer is almost twice smaller than that of H₂O and ~2.5 times smaller than in pure D₂O (~1.7 in the case of H₂O).

LITERATURA

- ANEZO C., DE VRIES A. H., HOLTE H. D., TIELEMAN D. P., MARRINK S. J., 2003. *Methodological issues in lipid bilayer simulations*. J. Phys. Chem. B 107, 9424–9433.
- BERKOWITZ M. L., 2009. *Detailed molecular dynamics simulations of model biological membranes containing cholesterol*. Biochim. Biophys. Acta 1788, 86–96.
- CIONI P., STRAMBINI G. B., 2002. *Effect of heavy water on protein flexibility*. Biophys. J. 82, 3246–3253.
- DAY C. A., KENWORTHY A. K., 2009. *Tracking microdomain dynamics in cell membranes*. Biochim. Biophys. Acta 1788, 245–253.
- DING J., STARLING P., EAST J. M., LEE G., 1994. *Binding sites for cholesterol on Ca²⁺-ATPase studied by using a cholesterol-containing phospholipid*. Biochemistry 33, 4974–4979.
- EDIDIN M., 2003. *The state of lipid rafts: from model membranes to cells*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 32, 257–83.
- EGBERTS E., MARRIK S.-J., BERENDSEN H. J. C., 1994. *Molecular dynamics simulation of phospholipid membrane*. Eur. Biophys. J. 22, 423–436.
- EPAND R. M., VOGEL H. J., 1999. *Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action*. Biochim. Biophys. Acta 1462, 11–28.
- GOSS R., LOHR M., LATOWSKI D., GRZYB J., VIELER A., WILHELM C., STRZALKA K., 2005. *Role of hexagonal structure-forming lipids in diadinoxanthin and violaxanthin solubilization and de-epoxidation*. Biochemistry 44, 4028–4036.

- LEACH A. R., 2001. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2nd edition, Pearson Education Ltd, Harlow.
- MURZYN K., ZHAO W., KARTTUNEN M., KURDZIEL M., RÓG T., 2006. *Dynamics of water at membrane surfaces: Effect of headgroup structure*. *Biointerphases* 1, 98–105.
- NAGLE, J. F., 1993. *Area/lipid of bilayers from NMR*. *Biophys. J.* 64, 1476–1481.
- NAGLE J. F., TRISTRAM-NAGLE S., 2000. *Structure of lipid bilayers*. *Biochim. Biophys. Acta* 1469, 159–195.
- PANDIT S. A., SCOTT H. L., 2009. *Multiscale simulations of heterogeneous model membranes*. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 136–148.
- PASENKIEWICZ-GIERULA M., TAKAOKA Y., MIYAGAWA H., KITAMURA K., KUSUMI A., 1997. *Hydrogen bonding of water to phosphatidylcholine in the membrane as studied by a molecular dynamics simulation: Location, geometry, and lipid-lipid bridging via hydrogen-bonded water*. *J. Phys. Chem. A* 101, 3677–3691.
- PASENKIEWICZ-GIERULA M., TAKAOKA Y., MIYAGAWA H., KITAMURA K., KUSUMI A., 1999. *Charge-pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes. A molecular dynamics simulation study*. *Biophys. J.* 76, 1228–1240.
- PEARSON H. R., PASCHER I., 1979. *The molecular structure of lecithin dihydrate*. *Nature* 281, 499–501.
- RÓG T., MURZYN K., MILHAUD J., KARTTUNEN M., PASENKIEWICZ-GIERULA M., 2009. *Water isotope effect on the bilayer properties: a molecular dynamics simulation study*. *J. Phys. Chem. B* 113, 2378–2387.
- RÓG T., MURZYN K., PASENKIEWICZ-GIERULA M., 2002. *The dynamics of water at the phospholipid bilayer surface: a molecular dynamics simulation study*. *Chem. Phys. Lett.* 352, 323–327.
- SEDDON J. M., TEMPLER R.H., 1995. *Polymorphism of lipid-water systems. [W:] Structure and dynamics of membranes. From cells to vesicles*. LIPOWSKY R., SACKMANN E. (red). Elsevier Science, Amsterdam, 97–160.
- SIMONS K., TOOMRE D., 2000. *Lipid rafts and signal transduction*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31–41.
- SINGER S. J., NICOLSON G. L., 1972. *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. *Science* 175, 720–731.
- SONNE J., JENSEN M. Ø., HANSEN F. Y., HEMMINGSEN L., PETERS G. H., 2007. *Reparameterization of all-atom dipalmitoylphosphatidylcholine lipid parameters enables simulation of fluid bilayers at zero tension*. *Biophys. J.* 92, 4157–4167.
- SUBCZYNSKI W. K., KUSUMI A., 2003. *Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy*. *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 231–243.
- TAYLOR K. M. P., ROSEMAN M., 1996. *Effect of cholesterol on the tight insertion of cytochrome b_5 into large unilamellar vesicles*. *Biochim. Biophys. Acta* 1278, 35–40.
- VAN DEN BRINK-VAN DER LAAN E., KILLIAN J. A., DE KRUIJFF B., 2004. *Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile*. *Biochim. Biophys. Acta* 1666, 275–288.
- WOOLF, L. A., 1976. *Tracer diffusion of tritiated heavy water (DTO) in heavy water (D_2O) under pressure*. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1267–1273.