

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Tomáš Blovský

**Interakce peptidů s modifikovanými lipidovými membránami
(Počítačová studie)**

Interactions of peptides with modified lipid membranes (Computer study)

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

Školitelka: Doc. Ing. Zuzana Limpouchová, CSc.

Konzultant: prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha 2020

Poděkování

Na tomto místě bych s velikou úctou chtěl poděkovat několika osobám. Nejprve té nejlepší školitelce doc. Ing. Zuzaně Limpouchové, CSc. za její trpělivost, čas a zodpovědné vedení této bakalářské práce, za její schopnost mě vždycky uklidnit a podpořit, za její sílu vydržet jak mě, tak i náročnou biochemii. Nesmím zapomenout poděkovat Mgr. Karlu Šindelkovi, PhD., který mi ukázal krásu programu \LaTeX – se kterým mi již tolikrát pomohl – ve kterém byla tato práce napsána, dále mu děkuji za jeho programy, pomocí nichž jsem zpracovával svoje výsledky a též za jeho nekonečnou trpělivost a podporu při učení se s programem DL_MESO. Děkuji prof. RNDr. Karlu Procházkovi, DrSc., který projevil obrovskou ochotu projít celou práci a svými cennými radami přispěl velkou vahou k celkovému zlepšení této práce. Dále mu též vyjadřuji svůj vděk za jeho podněty a návrhy k samotným simulacím. prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, PhD. děkuji za jeho štědrá pomoc a ochotu poskytnutou ohledně problematiky biomembrán. Děkuji prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za kritické připomínky.

Dík si zaslouží mí kamarádi z křemíku, zejména Glados a Elan z MetaCentra, které jsem využíval pro samotné simulace.

Děkuji též svým kamarádům za jejich podporu a pomoc, kdykoliv jsem o ní požádal, dále mému nejlepšímu kamarádovi Tomáši Plačkovi, který se mnou dokázal vydržet od základní školy, děkuji též Martinovi, který vytiskl tuto práci. A to nejlepší nakonec, děkuji též mé mamince, která je pro mě velkou oporou ve všech životních situacích.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 14.6. 2020

Tomáš Blovký

Obsah

Obsah	1
Seznam zkratk a symbolů	3
Abstrakt	7
Abstract	8
1 Přehled současné problematiky	9
1.1 Motivace	9
1.2 Biologické membrány	10
1.2.1 Struktura membrány	10
1.2.2 Stavební složky biomembrán	13
1.2.3 Fyzikální vlastnosti biomembrán	18
1.2.4 Termodynamika membránového přenosu	23
1.3 Antimikrobiální peptidy	25
1.3.1 Účinky AMP	25
1.3.2 Struktura AMP	26
1.3.3 Interakce AMP s membránou	26
1.3.4 Využití počítačových simulací ke studiu interakcí AMP	27
1.4 Počítačové modelování membrán	28
1.4.1 Molekulární dynamika: Zhrubené modely	28
1.4.2 Disipativní částicová dynamika	28
1.4.3 Elektrostatika v DPD	30
1.4.4 Redukované jednotky	32
2 Cíl práce	33

3	Výsledky	34
3.1	Použitý model a jeho ověření	34
3.1.1	Použitá metoda a parametry	34
3.1.2	Nabitá membrána v roztoku s dvojmocnými kationty	37
3.1.3	Nabitá membrána v roztoku s dvojmocnými kationty a peptidy	40
4	Diskuze	43
5	Závěr	46
	Literatura	47

Seznam zkratek a symbolů

α	parametr ovlivňující konvergenci v Ewaldově sumě
α	repulzní parametr
$\Delta\mu_{\text{hyd}}^{\circ}$	hydratační energie
ΔG_c	koncentrační gradient
Δt	časový krok
γ	povrchové napětí
γ	povrchové napětí
γ_{ij}	koeficient disipativní síly
λ_e	Slaterova rozpadová délka náboje
μ_{ext}	chemický potenciál mimo membránu
μ_{ext}	chemický potenciál uvnitř membrány
ρ	hustota částic v simulačním boxu
ρ_e	nábojová hustota
σ_{ij}	koeficient náhodné síly
ε_0	dielektrická konstanta
ε_r	permitivita prostředí
ζ_{ij}	Gaussovo náhodné číslo
A_{eq}	rovnovážná plocha povrchu na jednu molekulu

a_{ij}	repulzní koeficient mezi částicemi i a j
C^*	specifická hodnota koncentrace pro daný amfifil
c_{ext}	koncentrace iontu vně membrány
c_{int}	koncentrace iontu uvnitř membrány
c_{II}	koncentrace na vnitřní straně membrány
c_I	koncentrace na vnější straně membrány
F_{ij}^{el}	elektrostatická síla mezi i -tou a j -tou částicí
k_{off}	disociační rychlostní konstanta
k_{on}	asociační rychlostní konstanta
K_p	rozdělovací konstanta
l_B	Bjerrumova délka
m_i	hmotnost i -té DPD částice
N_m	počet molekul rozpouštědla v jedné DPD částici
N_q	počet nábojů
r_0	rovnovážná vzdálenost
r_c	dosah konzervativní síly
r_{ij}	vzdálenost mezi částicemi i a j
t_0	časová jednotka
U^{el}	celková elektrostatická energie
U^{CG}	zhrubený potenciál
w^D	váhová funkce disipativní síly
w^R	váhová funkce náhodné síly
z_{K^+}	počet nábojů draslíku

z_{Na^+}	počet nábojů sodíku
k_B	Boltzmannova konstanta
\mathbf{e}_{ij}	jednotkový vektor mezi i -tou a j -tou částicí
\mathbf{F}_{ij}^C	konzervativní síla mezi i -tou a j -tou částicí
\mathbf{F}_{ij}^D	disipativní síla mezi i -tou a j -tou částicí
\mathbf{F}_{ij}^R	náhodná síla mezi i -tou a j -tou částicí
\mathbf{F}_i	celková síla působící na i -tou částici
\mathbf{j}	hustota toku
\mathbf{m}	$\mathbf{m} = (m_x, m_y, m_z)$ celočíselný vektor
\mathbf{n}	$\mathbf{n} = (n_x, n_y, n_z)$ celočíselný vektor
\mathbf{r}_i	polohový vektor i -té částice
\mathbf{v}_{ij}	rychlost mezi i -tou a j -tou částicí
r	vzdálenost od středu membrány
\mathbf{F}	Faradayova konstanta
A	plocha rozhraní
c	koncentrace
D	difúzní koeficient
d	tloušťka membrány
G	Gibbsův potenciál
H	entalpie
K	rozdělovací koeficient
k	tuhost vazby
k	velikost vektoru \mathbf{k}

m_i	hmotnost i -té částice
N	počet částic
P	permeabilitní konstanta
P	tlak
S	entropie
T	termodynamická teplota
V	objem simulačního boxu
AMP	antimikrobiální peptidy
DPD	Disipativní částicová dynamika
EPR	Elektronová paramagnetická rezonance
erfc	komplementární chybová funkce
ESR	Elektronová spinová rezonance
LPS	lipopolysacharid
MD	molekulární dynamika
MRSA	Meticilin-rezistentní zlatý stafylokok
NMR	nukleární magnetická rezonance

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá aktuální problematikou tzv. antimikrobiálních beta-peptidů a jejich syntetických analogů, které jsou účinné proti široké škále (multirezistentních) bakterií. Pomocí disipativní částicové dynamiky byl studován mechanismus antibakteriálního působení relativně krátkých peptidů navržený v práci (Qian, Chen a kol. 2018) v modelovém systému obsahujícím nabitou fosfolipidovou membránu spontánně vzniklou v roztoku jednomocných (Na^+ a K^+) a dvojmocných kationtů (Ca^{2+} a Mg^{2+}) s přidavkem kladně nabitých peptidů. Mechanismus kompetitivního elektrostatického navázání peptidů na membránu a uvolnění dvojmocných kationtů, které jsou pro funkci bakterií potřebné, navržený autory experimentální studie (Qian, Chen a kol. 2018) byl pomocí simulací potvrzen. Dále bylo ukázáno, že působení peptidu závisí i na způsobu, jak jsou změny koncentrací složek systému realizovány.

Klíčová slova: lipidové membrány, antimikrobiální peptidy, počítačové simulace, disipativní částicová dynamika.

Abstract

The bachelor thesis is focused on the up-to-date topic of so-called antimicrobial betapeptides and their synthetic analogues that show efficient effect against a variety of resistant bacteria. The mechanism of antibacterial function of relatively short peptides suggested in (Qian, Chen *et al.* 2018) was studied by Dissipative Particle Dynamics in a model system containing a charged phospholipid membrane spontaneously self-assembled in solutions containing monovalent (Na^+ a K^+) and bivalent cations (Ca^{2+} a Mg^{2+}) with the admixture of positively charged peptides. The hypothesis proposed by the authors of the experimental study (Qian, Chen *et al.* 2018) that the positively charged peptides interact strongly with membrane replacing and expelling the positively charged bivalent cations out of the membrane into bulk solution was verified by computer simulations. Further it was also shown that the effect peptides depends also on the way how the changes of component concentrations are achieved.

Keywords: lipid membranes, antimicrobial peptides, computer simulations, dissipative particle dynamics.

[IN CZECH]

1 Přehled současné problematiky

1.1 Motivace

V současné době je pozorován velký nárůst rezistence bakterií vůči antibiotikům např. v důsledku horizontálnímu přenosu plasmidů transdukci, konjugací, transformací. Z jedním mechanismů rezistence je snížení permeability buněčných membrán bakterií. Proto se pozornost soustřeďuje na hledání nových antimikrobiálních látek, které ničí mikroby tím, že rozrušují jejich biomembrány. Jednou z perspektivních možností jsou antimikrobiální peptidy, označované zkratkou AMP s antimikrobiálním účinkem [1]. Mechanismus účinku dostatečně dlouhých AMP spočívá ve zvyšování permeability a narušování bakteriální membrány tvorbou pórů, kterými se tak dostávají do intracelulárního prostoru bakterií, kde poškozují komponenty cytoplazmy či inhibují metabolické reakce. K úpravě povrchů (např. povrchy medicínálních implantátů či povrchy v nemocnicích [2]) se však užívají také krátké peptidy, které však musí využívat jiný mechanismus narušování buněk bakterií, protože jsou kratší, než je tloušťka jejich membrán.

Intenzivně studovanou bakterií je meticilin-rezistentní zlatý stafylokok *Staphylococcus aureus* (MRSA), který byl jedním z hlavních patogenů způsobující časté a vážné infekce, které byly spojeny s různými biomedicínskými povrchy (hlavně v nemocničních prostředí, např. kachličky, kanyly atd.). Experimentálně bylo prokázáno, že povrch modifikovaný peptidem, který napodoboval biokompatibilní polymer, má překvapivě vysokou baktericidní aktivitu proti *E. coli* a MRSA [3]. Jelikož se peptidy kovalentně navázané na povrch nemohou volně pohybovat a navíc jsou příliš krátké a nemohou tudíž proniknout buněčnou membránou, byl v [3] navržen mechanismus účinku založený na silných elektrostatických interakcích jejich násobně nabitých řetězců se záporně nabitými ostrůvky. Peptidy vytěsní dvojmocné ionty (Ca^{2+} , Mg^{2+}), které jsou nezbytně nutné pro správnou funkci bakteriálních buněk. Pro potvrzení této hypotézy byly bakterie inkubovány s biokompatibilními polymerními povrchy modifikovanými betapeptidy a byl pozorován výrazný pokles jejich letálního účinku. Po přidání dvojmocných iontů do roztoku došlo až k 80% zvýšení to-

hoto účinku a po přidání chelatačního činidla (např. EDTA) došlo k opětovnému poklesu letálního účinku.

1.2 Biologické membrány

Biologické membrány izoluje vnitřek buňky od okolí a jsou tak nezbytnou a nedílnou součástí všech prokaryotických (např. bakterie) a eukaryotických (např. živočichové) buněk. Jsou semipermeabilní (polopropustné) a propouštějí do buněk jenom určité látky. Jsou to poměrně složité struktury, které se kromě pasivního či aktivního transportu podílejí také na komunikaci buňky s okolím a v nichž probíhají různé metabolické procesy.

1.2.1 Struktura membrány

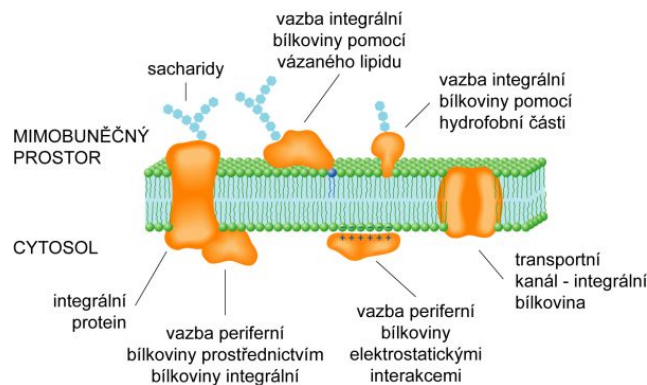
Stavba membrány prokaryotických buněk

Společným základem je dvojvrstva fosfolipidů¹, kdy hydrofobní řetězce mastných kyselin jsou orientovány směrem dovnitř a hydrofilní fosfátové skupiny směřují ven a tvoří povrch membrány, který interaguje výhodně s okolním vodným prostředím (1.1). Do dvojvrstvy jsou začleněny i proteiny, a to integrální a periferní. Integrální proteiny prostupují membránou. Existují různé odchylky stavby biomembrán u různých organismů. Jmenujme například přítomnost L-glycerolu v membráně archeí či cholesterolu v membráně eukaryot [5]. Vchlípením membrány vznikají mesosomy (u heterotrofních bakterií), chromatofory (u fotosyntetizujících bakterií; nesou fotosyntetické pigmenty). Na membráně je koncentrační gradient molekul, iontů a elektrických nábojů. Tvoří se tak klidový membránový potenciál, jehož změny se uplatňují při činnosti buňky [6].

V bakteriálních membránách se vedle lipidů nacházejí též hopanoidy, což jsou pentačyklické látky odvozené od hopanu. Zastupují funkci cholesterolu, který se vyskytuje u eukaryotních buněk. Ovlivňují tekutost², permeabilitu a rigiditu membrány [8]. Biomembrány jsou udržovány v organizovaném uspořádání nekovalentními interakcemi (síly van der Waalovy, vodíkové můstky, hydrofobní efekt atd.). Lipidová dvojvrstva má vlastnosti, které splňují naše očekávání: je nepropustná pro ionty a většinu (velkých) polárních molekul. Je kapalná, takže vytváří vhodné prostředí pro membránové proteiny, samovolně zacelí otvor vzniklý v membráně a konečně umožňuje splynutí membrán, když se dvě

¹kterou již v roce 1925 navrhli E. Gorter a F. Grendl [4].

²Tekutost membrány ovlivňuje i zastoupení nenasycených mastných kyselin. Čím více jich je, tím je membrána tekutější [7].



Obrázek 1.1: Jednoduchý model membrány.

http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002_v1/hesla/membrana_biologicka.html

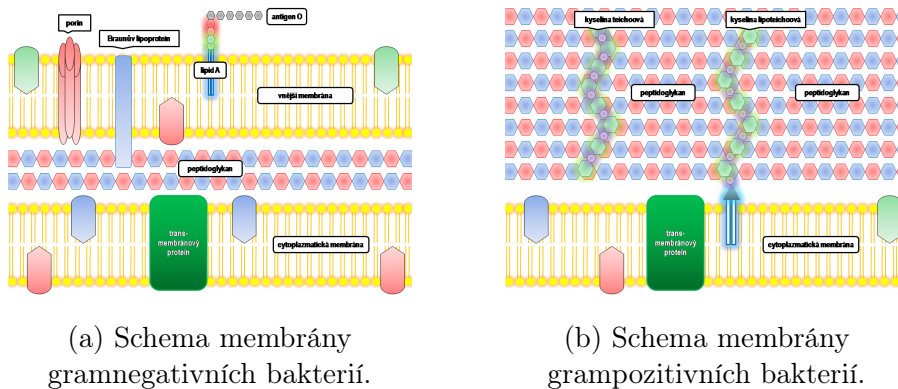
buňky spojují v jedinou [4].

Na základě tzv. Gramova barvení buněčné stěny bakterií lze bakterie rozlišit na gram-negativní a grampozitivní. Gramnegativní bakterie se barví růžově, kdežto grampozitivní fialově.

Gramnegativní bakterie mají dvojrstevnou membránu – vnitřní a vnější, které obklopují peptidoglykanovou buněčnou stěnu. Vnější membrána obsahuje lipopolysacharid, membránové proteiny a fosfolipidy [5]. LPS působí jako virulentní faktor. Na LPS se váže tzv. S-vrstva, což je vysoce organizovaná povrchová vrstva složená z proteinů a glykoproteinů, které jsou zakotvené do buněčné stěny. S-vrstva tvoří pravidelné struktury dlaždicovitého a čtvercového tvaru. S-vrstva udržuje pevnost a udává tvar buněčné stěny, stabilizuje membránu. Její funkcí je ochrana před změnami pH, osmotickým stresem, škodlivinami, viry. Ochraňuje buňku před fagocytózou a účinky komplementu. Pomáhá buňce adherovat k povrchům. Pro zvýšení pevnosti a integrity buněčné stěny propojuje vrstvu peptidoglykanu s vnější membránou tzv. Braunův lipoprotein [5].

Grampozitivní bakterie mají jednovrstevnou lipidovou membránu a silnou vrstvu peptidoglykanu. Proto se též nazývají jako monodermní bakterie (chybí jim vnější membrána). Mezi vrstvami peptidoglykanu se nachází dlouhé aniontové polymery kyseliny teichoové, které jsou složeny z glycerolfosfátů a ribitolfosfátů, navázaných na sebe přes fosfodiesterové vazby. K peptidoglykanu jsou vázány kovalentně. K hlavičkám membránových lipidů jsou připojeny molekuly kyseliny lipoteichoové. Povrch gramnegativních bakterií je bohatý na proteiny, které jsou podobné těm, které se nacházejí v periplazmě gramnegativních buněk. Některé z nich jsou vázány k lipidovým kotvám, které jsou zasazené do membrány, jiné jsou kovalentně vázány na peptidoglykan [9]. Kyselina teichoová a kompozice povrchové

vých proteinů hraje důležitou roli v adaptaci na okolní prostředí a růstu bakterií, např. *B. subtilis* [10]. Obr. 1.2 ukazuje jednoduchým způsobem membránu gramnegativních a grampozitivních bakterií.



(a) Schema membrány gramnegativních bakterií.

(b) Schema membrány grampozitivních bakterií.

Obrázek 1.2: Schema membrány gramnegativních a grampozitivních bakterií.

(a) převzato z <http://mikrobiologie.xf.cz/files/imgs/g-stena-big.PNG>

(b) převzato z <http://mikrobiologie.xf.cz/files/imgs/g+stena-big.PNG>

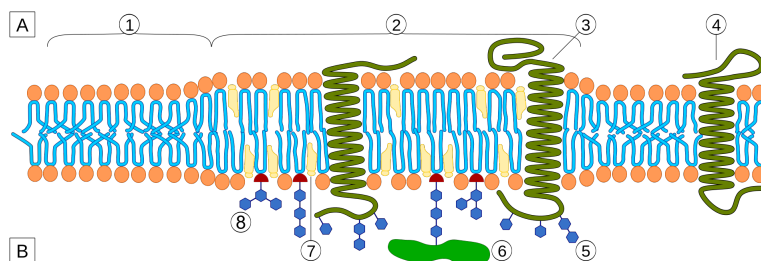
Stavba biomembrány eukaryotických buněk

Biomembrána eukaryotických buněk je též sestavena z dvojvrstvy fosfolipidů, do dvojvrstvy jsou zanořeny membránové proteiny. Místo hopanoidů je zde však cholesterol.

Mnoho membrán má domény, které jsou bohaté na proteiny. Některé membrány mají dokonce velké množství specifického proteinu, např. bakteriorhodopsinu ve fialové membráně *Halobacterium salinarum* a poriny ve vnější membráně gramnegativních bakterií (viz Obr. 1.2a) [11]. Domény s velkým množstvím proteinů často potřebují specifické druhy lipidů, tzv. hraniční lipidy, což je skupina lipidních molekul, které se přednostně vážou na povrch membránových proteinů. Jsou částečně znehybněny v důsledku interakce lipid-protein. Polární hlavičky těchto lipidů se mohou vázat na hydrofilní části membránových proteinů. Hydrofobní část membránových proteinů je zanořena mezi řetězce mastných kyselin. Hraniční lipidy mají funkci „mazací“ vrstvy pro povrchy proteinů, čímž se tedy mohou membránové proteiny pohybovat v membráně pomocí volné rotace a laterální difúze. Tepelná denaturace membránových proteinů může zničit jejich sekundární a terciární strukturu, tím se odhalí nové povrchy membránovým lipidům, a tak se zvýší počet lipidních molekul v hraniční vrstvě [11]. Tento jev lze studovat pomocí EPR [12].

Za zmínku stojí tzv. lipidové rafty. To jsou glykolipoproteinové mikrodomény, tvořené kombinací glykosfingolipidů a proteinových receptorů. Ovlivňují fluiditu membránu a transport membránových proteinů. Lipidové rafty představují více organizovanou struk-

turu než zbylá dvojvrstva, volný pohyb je však umožněn [11]. Lipidový raft je znázorněn na Obr. 1.3.



Obrázek 1.3: Lipidový raft. A – cytosol, B – extracelulární prostor, 1 – běžná lipidová vrstva (neraftová), 2 – lipidový membránový raft, 3 – transmembránový protein asociovaný s lipidovým raftem, 4 – neraftový membránový protein, 5 – glykosylační modifikace na glykoproteinech a glykolipidech, 6 – GPI-zakotvený protein, 7 – cholesterol, 8 – glykolipid.

https://cs.wikipedia.org/wiki/Lipidov%C3%BD_raft#/media/Soubor:Lipid_raft_organisation_scheme.svg

1.2.2 Stavební složky biomembrán

Lipidy jsou estery vyšších mastných kyselin a alkoholů (či jejich derivátů). Všechny membránové lipidy jsou amfipatické povahy (obsahují jednak hydrofilní část, jednak hydrofobní část) [4].

Tabulka 1.1: Lipidové složky některých biomembrán (hm. %), převzato a upraveno z [4].

Lipidová složka	Mitochondrie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Azobacter agilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
cholesterol	5	–	–	–
fosfatidylethanolaminy	28	17	100	100
fosfatidylseriny	–	8	–	–
fosfatidylcholiny	48	47	–	–
fosfatidylinositoly	8	22	–	–
disfosfatidylglyceroly	1	0,3	–	–
sřingomyeliny	–	2	–	–
cerebrosidy	–	–	–	–
ceramid	–	–	–	–
jiné	10	3,7	–	–

Tabulka 1.1 ukazuje, že většina membránových lipidů jsou fosfolipidy, což jsou deriváty glycerolu, v nichž hydroxylové skupiny na C₁ a C₂ jsou esterifikovány nasycenými i nenasyčenými mastnými kyselinami, obsahujícími obvykle 14 až 24 atomů uhlíku a hydroxylová

skupina na C₃ je esterifikována kyselina trihydrogenfosforečnou [4]. Zbytek kyseliny trihydrogenfosforečné je esterifikován hydroxylovou skupinou různých alkoholů či aminoalkoholů (cholinu, ethanolaminu, serinu, inositolu, glycerolu).

Hlavní složku neutrálních lipidů tvoří mastné kyseliny. Mastné kyseliny jsou alifatické karboxylové kyseliny. Mohou být přítomny v podobě esterů (vázané mastné kyseliny) či jako volné mastné kyseliny (tj. neesterifikovány). Mají zpravidla nevětvený řetězec obsahující sudý počet uhlíkových atomů (jsou syntetizovány z dvouuhlíkatých jednotek). Řetězec může obsahovat vedle jednoduchých vazeb i vazby dvojné (jednu či více) [7].

Mastné kyseliny přítomné v bakteriích ukazuje tabulka 1.2.

Tabulka 1.2: Mastné kyseliny přítomné v bakteriích, převzato a zkráceno z [13]

Nasyčené MK	Hydroxykyseliny	Větvené MK	Nenasycené MK
Laurová	β -hydroxymásečná	Isooktanová	Palmitoolejová
Myristová	Mevalonová	Korinnová	Olejová
Stearová	β -hydroxymyristová	Diptherová	<i>cis</i> -vakcenová
Arachidová			
Behenová			
Lignocerová			
Montanová			

Z velké části se jedná o mastné kyseliny s dvojnou vazbou v poloze *cis*. V bakteriích existují však i *trans* nenasycené mastné kyseliny [14], např. bakterie *Eubacterium lentum* redukuje nenasycené mastné kyseliny – jako je linolová a linolenová – aby produkovala velké množství kyseliny stearové a *trans* acyl deriváty [14].

Vedle lipidů jsou v biomembránách zakomponovány proteiny. Lipidy vytvářejí funkční prostředí pro proteiny. Zastoupení lipidů a proteinů velmi kolísá v různých membránách, například nejvíce bílkovin (75 %) obsahují membrány, na kterých se odehrávají metabolické pochody, tj. mitochondrie a chloroplasty [4].

Membránové proteiny mají zvláštní rozložení hydrofilních a hydrofobních aminokyselinových zbytků, jelikož jsou v kontaktu jednak s hydrofobní lipidovou dvojrůstvou, jednak polárním vodným prostředím [4]. Rozlišujeme integrální (které mohou být i transmembránové³) a periferní (vnější) proteiny.

Integrální proteiny jsou zanořené do lipidové dvojrůstvy nebo jí přímo procházejí. Hydrofobní charakter zanořených oblastí umožňuje existenci v nepolárním prostředí [4]. Ty jsou ve dvojrůstvě drženy hydrofobním efektem. Krom hydrofobní části mají i hydrofilní

³Neplatí však, že každý integrální protein je transmembránový.

část, která jim dovoluje vyčnívat z membrány a tím dochází k interakcím látek rozpustných ve vodě s povrchem membrány [4].

Periferní membránové proteiny jsou většinou kyselé povahy a jsou poutány k membráně slabými elektrostatickými a vodíkovými vazbami, často prostřednictvím dvojmocných kationtů k hydrofilním částem membránových lipidů [4]. Proto je lze oddělit od membrány porušením polárních vazeb, např. zvýšením iontové síly (změna pH) [15] či extrakcí zředěnými roztoky neutrálních solí [4]. Jsou to většinou enzymy, umístěné na vnitřní straně buňky [4].

Vztah periferních a integrálních proteinů k membráně dle [11]

Jak již bylo dříve zmíněno, biomembrána má v sobě jednak vnořené, jednak přidružené proteiny. Vnoření proteinů do lipidové dvojvrstvy zahrnuje polární a nepolární interakce.

Důležitou rodinou periferních proteinů je rozličná skupina fosfolipas, tj. ve vodě rozpustných enzymů, které štěpí molekuly fosfolipidů. Některé z fosfolipas jsou klíčovými regulátory, které produkují tzv. druhé posly (buněčná signalizace). Mezi známé fosfolipasy patří fosfolipasa C, která odštěpuje diacylglycerolový zbytek (tj. diacylglycerol, který aktivuje proteinkinasu C), fosfolipasa A1 (resp. A2), štěpící acylový zbytek na C1 (resp. C2) pozici glycerolového zbytku.

V eukaryotických buňkách se dále vyskytují tzv. annexiny, což je velká skupina proteinů, které vyžadují Ca^{2+} ionty k navázání na membránu. Afinita těchto proteinů k membráně je nízká v nepřítomnosti lipidů a vysoká v přítomnosti aniontových lipidů. Mají dynamickou funkci, tj. organizují endocytózu a přenos lipidů. Mají i funkci imunitní, protože jsou používány jako markery pro apoptózu, a tak jsou intenzivně studovány.

Periferní proteiny, které se vážou k membráně slabě a reverzibilně a jsou vazbou regulovány, se nazývají amfitropické. Jsou zahrnuty v mnoha důležitých biologických funkcích. Jejich aktivita je regulována změnou z formy rozpustné ve vodě na formu, kdy jsou navázány k membráně. Mezi amfitropické proteiny patří např. fosfolipasa C a proteinkinasa C.

Proteiny zakotvené k lipidům jsou přítomné jednak v bakteriích jakožto lipoproteiny v *E. coli*, jednak v eukaryotických buňkách.

Integrální membránové proteiny prostupují membránou. Lze je klasifikovat jako typ I, kdy je jejich N-konec venku, nebo typ II, kdy je jejich C-konec venku. Existují i integrální proteiny typu III, které prostupují membránou několikrát díky smyčkám. Analýza struktury a mutagenese integrálních membránových proteinů vedle k některým zobecněním ohledně umístění aminokyselin v nepolární membránové doméně. Tak nepolární ami-

nokyseliny se typicky nacházejí v α -helixech, postranní řetězce aminokyselin vyčnívají do hydrofobních částí dvojvrstvy (podpořeno termodynamickým hlediskem). Kyselé a bazické aminokyseliny buď zůstávají nenabitě kvůli nízké dielektrické konstantě membránových proteinů, nebo tvoří iontové páry, čímž je výsledný náboj nulový anebo mají buď funkci transportní, kdy přenášejí protony či elektrony nebo váží kofaktor jako je hem či retinal. Aromatické kyseliny (zejména tryptofan a tyrosin) hrají speciální roli v mezifázi hydrofilních a nepolárních domén jednak v α -helixech a β -barelech integrálních membránových proteinů.

V těchto β -barelech je úzká souvislost mezi sekundární a terciární strukturou, protože protein obsahuje β -vlákno („strand“), které se stáčí a vytváří tak kompaktní strukturu, ve které je první a poslední vlákno spojené vodíkovou vazbou. Tyto vlákna jsou obecně uspořádány antiparalelně, takže N-konec jednoho vlákna je přilehlý k C-konci dalšího vlákna. Taková kompozice se vyznačuje velkou stabilitou, protože se tak vytvoří síť vodíkových vazeb mezi funkčními skupinami karbonylovou a aminovou, které preferují planární geometrii [16].

Interakce periferních a integrálních proteinů s dvojvrstvou

Biologické membrány jsou typicky složeny jednak z kladně nabitých sloučenin, jako je fosfatidylethanolamin, fosfatidylcholin, sfingolipidy, jednak záporně nabitých, např. fosfatidylglycerol, fosfatidylinositol a kardiolipin. Nabité hlavičky fosfolipidů dávají vzniku koncentračních gradientů na povrchu membrány. Nabité membránové povrchy pak dávají vzniku dalekodosahovým elektrostatickým interakcím mezi periferními proteiny a lipidovými hlavičkám [17].

Právě elektrostatické přitahování mezi nabitými skupinami na periferních proteinech a nabitými skupinami na lipidech, příp. proteinových komponentech membrány je důležitým mechanismem. Změny, které působí na náboje na těchto periferních proteinech, mění jejich afinitu k membráně a nastavují jakýsi „elektrostatický spínač“, který kontroluje jejich vazbu.

Druhým mechanismem je vložení lipidové kotvy, což se děje, když proteiny s kovalentně vázanými acylovými řetězci mohou výrazně změnit pozici těchto řetězců ve vodní formě a ve formě, kdy jsou navázány na membráně. Ve vodní formě takového proteinu je acylový řetězec izolován do vnitřku proteinu. V případně u membrány vyčnívá z bílkoviny a přitiskne se k membráně.

V případě třetího mechanismu existuje vazebné místo na proteinu pro konkrétní lipid. Vazebné místo je často specifické pro danou hlavičku lipidu. Spojení proteinu s membránou

závisí na afinitě proteinu pro daný lipid a též na koncentraci lipidů. Protein může mít tzv. „klapku“, která kryje vazebné místo (ve vodní formě), čímž se moderuje vazba do vazebného místa.

Čtvrtý mechanismus zahrnuje vložení amfipatického helixu do místa mezi membránou a proteinem, což vyžaduje jeho náročnou konformační změnu, která zpřístupní hydrofobní jádro membrány, a tím usnadní inzerci tohoto helixu [18].

Jak již bylo řečeno, elektrostatické interakce mají zásadní vliv na vazbu periferních proteinů na lipidy. Často vedle elektrostatických sil se uplatňují i hydrofobní interakce. Když periferní protein vkládá jeden či více acylových řetězců, aby se zakotvil do membrány, tak hydrofobní interakce hraje důležitou roli. Ukazuje se, že vazebná energie je úměrná délce řetězce. Vložení lipidového řetězce může pomoci lokalizovat zbytky periferního proteinu. Vazba lipidů vytlačuje vodu, tudíž zvyšuje hydrofobicitu povrchu proteinu, čímž spíše zvyšuje jeho afinitu k membráně.

Kontakt mezi integračními membránovými proteiny a lipidy musí být velmi úzký, aby se udržela základní vlastnost membrány, tj. její semipermeabilita. Přítomnost proteinu nemá v podstatě efekt na vzdálené lipidy, ale má markantní efekt na lipidy kolem sebe (hraniční lipidy). Experimenty s purifikovanými proteiny ukázaly, že mnoho membránových proteinů vyžaduje specifické lipidy (či třídy lipidů) ke stabilní vazbě či zanoření do dvojvrstvy, zatímco mnoho enzymů vyžaduje lipidy pro jejich aktivitu (viz Tab 1.3).

Tabulka 1.3: Specifické požadavky membránových proteinů a enzymů na lipidy, upraveno a zkráceno z [11]

Enzym	Delipidace	Reaktivace
1 Lipidová specificita pro reaktivaci delipidovaného enzymu		
Cytochrom <i>c</i> oxidasa	PLA ₂	Kardiolipin
beta-hydroxybutyrátdehydrogenasa	fosfolipasa A	jen fosfatidylcholin
Protein	Váže se na	Specifické požadavky
2 Požadavek amfipatických proteinů pro vazbu a aktivaci		
Proteinkinasa C	fosfatidylcholinové, fosfatidylserinové vezikuly	aniontové lipidy, fosfatidylserin a diacylglyceroly

Kardiolipin je důležitá látka, která se vyskytuje v mitochondriích a biomembráně bakterií. Je to glycerolfosfolipid, tvořený ze dvou molekul fosfatidátů napojených kovalentně na molekulu glycerolu. Změna pH a přítomnost dvojmocných kationtů mohou vyvolat strukturální změnu kardiolipinu. Má též úzký vztah k membránové fúzi, tj. proces, kdy ze

dvou, původně izolovaných lipidových dvojvrstev, vznikne jedna struktura tím, že se spojí jejich hydrofobní jádra do sebe [5].

V [19] bylo ukázáno, že v *E. coli*, pozměněné mutací, se tvoří membránové domény, které postrádají kardiolipin, a přesto se daná bakterie relativně normálně dělila.

První informace o tom, jak by mohly lipidové molekuly interagovat s integrálními proteiny vzešla z ESR, kde se užily spinově označené fosfolipidové molekuly. Tyto molekuly pak poskytly informaci ohledně pohybu mastných acylových řetězců [20].

Peptidy včleňující se do membrány

Mezi takovéto peptidy patří mnoho antimikrobiálních peptidů a peptidových toxinů. Dalšími peptidy, které se mohou včlenit do membrány jsou ionofory, pojmenované kvůli jejich afinitě k iontům, které mohou být vysoce specifické. Zatímco některé ionofory jednoduše vytvoří s iontem chelát a obklopí ho lipidní obálkou, jiné se zanoří do membrány, aby vytvořily iontový kanál. Alamethicin a gramicidin jsou dva široce studovaného ionofory, které umožnily pochopení proteinových iontových kanálů [11].

1.2.3 Fyzikální vlastnosti biomembrán

Hnací síly spontánní asociace

Vznik membrány je složitým výsledkem kombinace různých sil jako jsou elektrostatické, van der Waalsovy a vodíkové vazby [21].

Pro určení celkové energie přenosu jednoho lipidu z roztoku do asociátu se podobně jako při popisu jiných asociačních procesů užívá změna molárního Gibbsova potenciálu čili chemického potenciálu, který je dán vztahem

$$\Delta\mu = \Delta\mu^\circ + k_B T \ln C, \quad (1.1)$$

kde k_B je Boltzmannova konstanta, T je termodynamická teplota, C je koncentrace a $\Delta\mu$ je změna chemického potenciálu (μ° je standardní chemický potenciál při standardním stavu látky (tj. čistá látka)). Znaménko a velikost $\Delta\mu^\circ$ je nejčastěji ukazatel toho, jak moc dané síly ovlivňují danou molekulu [21].

Hydrofobní síly

Lipidové ocásky jsou nepolární a nenabitě, proto intermolekulární síly nemají na ně velký vliv. Nicméně energie hydratace nepolárních lipidových ocásků, $\Delta\mu_{\text{hyd}}^\circ$, je co do velikosti největší energií, která přispívá ke změně chemického potenciálu $\Delta\mu$ [21].

Hydratace malých organických molekul je charakterizována zápornou (příznivou) entalpií a pozitivní (nepříznivou) entropií [22]. U velkých molekul je tomu naopak. K vysvětlení odlišného chování vody blízko malých a velkých rozhraní se často odvolává na vznik vodíkových vazeb. Velké rozhraní totiž vytváří „houpající se“ vodíkové vazby (což stojí hydratační entalpií), kdežto tvorba vodíkových vazeb se může uskutečnit okolo malých hydrofobních látek (což stojí určitou entropií) [21]. Důkazy pro toto vysvětlení byly podány v [23].

Princip odporujících sil (opposing forces)

Pokud by jenom hydrofobní síly hrály roli ve spontánní asociaci lipidové dvojvrstvy, pak by lipidy splynuly do jediné fáze, separované od vody. Skutečnost, že amfifilní látky dokáží odolat takovému nežádoucímu výsledku vedla Tanforda k vyslovení principu odporujících sil [22].

V principu odporujících sil se uvažuje, že standardní chemický potenciál při standardním stavu látky $\Delta\mu^\circ$ se rozdělí na tři příspěvky. V [24] použili tento princip a odvodili vztah

$$\Delta\mu^\circ = \Delta\mu_{\text{hydrofob}}^\circ + \gamma A_{\text{eq}} + \frac{\alpha}{A_{\text{eq}}} = k_B T \ln(C^*), \quad (1.2)$$

kde $A_{\text{eq}} = \sqrt{\alpha/\gamma}$ je rovnovážná plocha povrchu na jednu molekulu, α je repulzní parametr hlaviček lipidů, γ je povrchové napětí. Hodnota C^* je specifická pro každý amfifil [21]. Největší váhu má první člen v rovnici 1.2, který řídí shlukování a lze ho spočítat podobnými úvahami a postupy, které byly popsány výše (viz [25]). Druhý člen souvisí s vystrčenými ocásky na povrchu micely a lze ho spočítat ze vztahu

$$(dG)_{T,P,N} = \gamma dA, \quad (1.3)$$

kde γ je povrchové napětí, A je plocha rozhraní a indexy u Gibbsova potenciálu značí, že teplota T , tlak P a počet částic N je konstantní [21]. Poslední třetí člen v rovnici 1.2 souvisí s repulzemi mezi hlavičkami lipidů, vzniká kvůli sterickým a dipól-dipól repulzím.

Roli v spontánní asociaci lipidů za tvorby lipidové membrány hrají též entalpie a hlavně entropie (krom samotného hydrofobního efektu). Entropie řídí chování hydrofobních látek

ve vodě (např. lipidy). Hydrofobní část lipidů nutí molekuly vody, aby se zorganizovaly do uspořádaného tvaru kolem nasycených částí molekul lipidů. To vede ke snížení entropie, protože se zabraňuje volné asociaci (díky vzniku vodíkových vazeb) molekul vody. Snížení entropie slouží jako hnací síla asociace lipidů mezi sebou, protože se tím sníží množství vody (vytlačí se), obklopující jejich molekuly, což vede ke zvýšení entropie (a tedy k více negativnějšímu Gibbsovu potenciálu). Tedy entalpické hledisko spočívá v tom, že lipidy chtějí být u sebe, kdežto na druhé straně chce systém docílit co největší entropie.

Fyzikální stav biomembrány nejlépe popisuje její fluidita [4]. Lipidová dvojvrstva má své typické uspořádání, avšak jednotlivé složky vykonávají chaotický pohyb (Brownův pohyb). V roce 1972 byl navržen model fluidní mozaiky (Singer a Nicholson [26]). Fosfolipidy neustále rotují kolem osy kolmé k membráně (rotační difúze), vibrují beze změny polohy a rychle se pohybují v rovině membrány (laterální difúze). Frekvence translačních pohybů jsou řádově v $\mu \text{ s}^{-1}$. Tak se u bakteriální buňky mohou molekuly lipidů přemístit z jednoho konce buňky na druhý v jediné sekundě [4]. Krom těchto translačních pohybů se vykonávají i překlápěcí pohyby (tzv. flip-flop pohyb) [4]. Fluidita závisí na teplotě (s vyšší teplotou roste), na množství nenasyčených mastných kyselin (s větším obsahem nenasyčených mastných kyselin roste) [15].

Difúze iontů

Při pasivním transportu iontů (elektrolytů) hraje významnou roli membránový potenciál. Například ve svalové buňce je intracelulární koncentrace draselných iontů mnohem vyšší než vně buňky, narozdíl od intracelulární koncentrace sodných iontů (sodík je mimobuněčný kation) [27]. Na povrchu membrány je kladný náboj (sodný kation), na vnitřní straně membrány je náboj záporný (je dán záporně nabitými zbytky kyseliny sialové v glykolipidech a glykoproteinech) [11]. Důsledkem je polarizace membrány. V klidovém stavu je tudíž uvnitř buňky více záporných iontů. Vzniká rozdíl elektrických napětí na obou stranách membrány, který nazýváme klidový membránový potenciál φ_m :

$$\varphi_m = \varphi_{\text{int}} - \varphi_{\text{ext}}, \quad (1.4)$$

kde φ_{int} je elektrické napětí na vnitřní straně membrány a φ_{ext} je elektrické napětí na vnější straně membrány. Jelikož na vnitřní straně membrány je více záporného náboje, je výsledný klidový membránový potenciál φ_m záporný [27].

Membránový potenciál souvisí s koncentracemi látek dle vztahu

$$c_{II} = c_I \exp\left(-\frac{zF\varphi_m}{RT}\right), \quad (1.5)$$

kde z je počet kladný nábojů iontu a F je Faradayova konstanta.

Představy o difúzi látek membránou se dají shrnout takto:

1. v membránách existují mikropóry. Těmi pronikají malé hydrofilní molekuly a za vhodných podmínek i voda,
2. v lipidních částec membrány se rozpouštějí podle svého rozdělovacího koeficientu K různé molekuly a ionty a postupně se přemístí na druhou stranu,
3. lipidová dvojvrstva je v chaotickém pohybu, a tak se tvoří tzv. poruchy, které vznikají rotací sousedních alifatických řetězců lipidů kolem vazeb C – C o 120°,
4. poruchy v membráně mohou vznikat jejich zakřivením (díky smrštění periferních proteinů) a působením tzv. flexoelektrické polarizace. Póry vzniklé tímto způsobem jsou pak schopny propouštět i neutrální molekuly a kationty [28].

Jelikož v biologických systémech panuje teplotní a tlaková rovnováha (tj. T a P je konstantní), je vhodné pro řešení otázek termodynamiky buňky užít Gibbsův potenciál G . Právě ten rozhoduje o tom, zda děj bude probíhat samovolně či nesamovolně (při konstantním tlaku a teplotě). Termodynamická definice je

$$G \equiv H - TS, \quad (1.6)$$

kde G je Gibbsův potenciál systému, H je entalpie systému, T je termodynamická teplota systému, S je entropie systému. Kritériem samovolnosti děje v uzavřeném systému⁴ při konstantním tlaku a teploty je vztah

$$(dG)_{T,P} \stackrel{\text{ir}}{\leq}_{\text{rev}} 0, \quad (1.7)$$

kde nerovnítko platí pro ireverzibilní děj a rovnítko pro reverzibilní.

Změna Gibbsova potenciálu v důsledku koncentračního gradientu ΔG_c lze pak zapsat ve tvaru

$$\Delta G_c = -RT \ln \frac{c_{\text{ext}}}{c_{\text{int}}}, \quad (1.8)$$

⁴V otevřeném systému musí navíc být konstantní počet částic N .

kde c_{ext} je koncentrace iontu vně membrány a c_{int} je koncentrace iontu uvnitř [29].

1.2.4 Termodynamika membránového přenosu

Přenos látek přes membránu se tradičně dělí na pasivní a aktivní. Při pasivním transportu se látky přenášejí difúzí nebo konvekcí, tj. samovolným dějem, a tak tyto procesy nepotřebují energii ve formě ATP [27]. Při aktivním transportu se na transport látky vyžaduje přísun energie (např. z chemické reakce), a tak proces může probíhat i proti směru koncentračního spádu dané látky.

A. Pasivní transport

Difúze neelektrolytů

Difúze se řídí 1. Fickovým zákonem

$$\mathbf{j} = -D\nabla c, \quad (1.9)$$

kde \mathbf{j} je hustota toku látky kolmo na plochu membrány, D je difúzní koeficient a ∇c je gradient koncentrace. Zákon tedy říká, že hustota toku je uměrná gradientu koncentrace [28].

Pokud uvažujeme o toku přes tenkou membránu, lze rovnici (1.9) přepsat do tvaru

$$j = -D \frac{c_{II} - c_I}{d} = P(c_I - c_{II}), \quad (1.10)$$

kde c_I a c_{II} jsou koncentrace na vnější a na vnitřní straně membrány, d je její tloušťka v cm a P permeabilitní konstanta v cm s^{-1} [28].

Pro látky pronikající přes lipidové oblasti membrány lze velikost permeabilní konstanty předpovědět s využitím dvou fyzikálních jevů. Jedná se o rozdělovací rovnováhu mezi roztokem a lipidními složkami membrány (příslušný rozdělovací koeficient se označuje K) a o difúzi uvnitř membrány charakterizovanou koeficientem D_m . Lze pak psát, že $P = KD_m/d$ [28]. Rozdělovací koeficient je definován vztahem $K = \exp\left(\frac{\mu_{\text{ext}} - \mu_{\text{int}}}{RT}\right)$, kde μ_{ext} je chemický potenciál mimo membránu a μ_{int} je chemický potenciál v membráně [27].

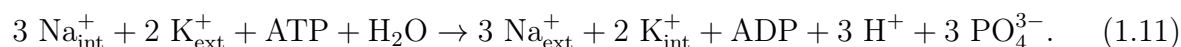
B. Aktivní transport

Pasivní transport je velmi pomalý. Efektivnější je aktivní transport, který je rychlejší, avšak vyžaduje přísun energie. Na membráně specifické proteinové přenašeče, které na jedné straně vážou látku, která se má transportovat a na druhé straně se od ní oddělí a vrátí se do původního stavu [27].

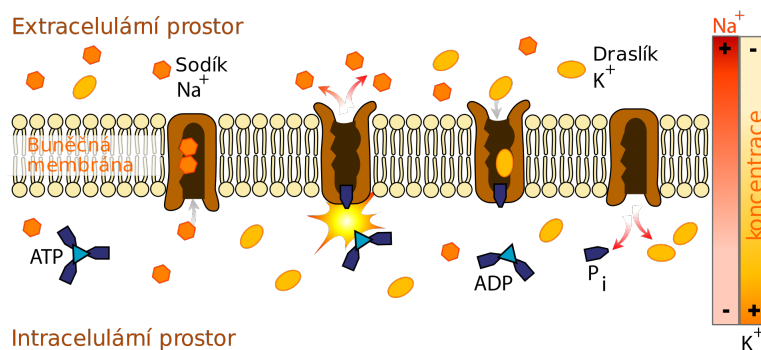
Dle počtu přenášených částic rozlišujeme:

1. uniport, tj. je přenášena jenom jedna molekula či ion,
2. kotransport, tj. jsou přenášeny dvě nebo více molekul či iontů. Kotransport dále dělíme podle vzájemného směru přenášených částic na:
 - (a) symport, tj. částice jsou přenášeny stejným směrem
 - (b) antiport, tj. částice jsou přenášeny opačným směrem.

Základními typy transportních proteinů jsou kanály a pumpy. Iontové kanály transportují například ionty sodné, draselné, vápenaté ve směru koncentračního gradientu. Transport zprostředkovávají pumpy ATPasy. Dle zdroje energie se rozlišuje primární aktivní transport (ATPasa využívá přímo energii z hydrolyzy ATP) a sekundární aktivní transport (je využito gradientu, který generuje některý iont). Typickým příkladem antiportu je Na^+/K^+ -ATPasa. Ta přenáší současně K^+ dovnitř a Na^+ ven z buňky – to popisuje rovnice 1.11:



Hnací silou pohybu iontů Na^+ a K^+ membránou jsou elektrochemické potenciály $\mu_{e,\text{Na}}$, $\mu_{e,\text{K}}$,



Obrázek 1.4: Schema ATPasy.

https://www.wikiskripta.eu/w/Iontov%C3%A9_pumpy#/media/File:Scheme_sodium-potassium_pump-cs.svg

které jsou dány vztahy

$$\begin{aligned} \mu_{e,\text{Na}} &= RT \ln \frac{[\text{Na}^+]_{\text{ext}}}{[\text{Na}^+]_{\text{int}}} + z_{\text{Na}^+} F \varphi_e, \\ \mu_{e,\text{K}} &= RT \ln \frac{[\text{K}^+]_{\text{ext}}}{[\text{K}^+]_{\text{int}}} + z_{\text{K}^+} F \varphi_e, \end{aligned} \quad (1.12)$$

kde z_{Na^+} a z_{K^+} jsou počty nábojů iontů sodíku, draslíku [27].

Další membránovou proteinovou pumpou je Ca^{2+} -ATPasa (uniport). Ta využívá energii uvolněnou při hydrolýze ATP k řízení pohybu Ca^{2+} sarkoplazmatickou membránou (význam nachází při svalové kontrakci, vzrůst koncentrace Ca^{2+} vyvolá kontrakci, kdežto pokles relaxaci) [27].

1.3 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (též membránově-aktivní peptidy) jsou hojně studovaná antibiotika, protože vykazují antimikrobiální účinek proti široké škále druhů bakterií, včetně multirezistentních bakterií. Kvůli jejich toxicitě však nastávají problémy při jejich využití jakožto účinných látek ve farmakologii. Proto se pro pochopení složitých interakcí mezi těmito peptidy a biologickými membránami užívají biofyzikální a teoretické metody (modelování membrán).

1.3.1 Účinky AMP

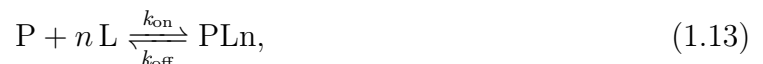
Antimikrobiální peptidy se koncentrují u povrchu membrán a interagují s nimi. Dlouhé AMP jimi většinou pronikají, kratší AMP je narušují jiným mechanismem. Při větším porušení buněčné membrány dochází k vylití buněčného obsahu.

V mechanismu vazby AMP na membrány se uplatňují elektrostatické interakce mezi pozitivně nabitými aminokyselinami a záporně nabitým povrchem membrány. Další roli hrají hydrofobní interakce mezi amfipatickými doménami peptidu a fosfolipidy. Pronikání AMP (ve vyšších koncentracích) bakteriálními membránami jim umožňuje jednodušší vstup do bakteriálních buněk [30].

K porozumění mechanismu účinku AMP je zapotřebí jednak prozkoumat interakce peptid-lipid (viz 1.3.3), jednak schopnost těchto molekul vázat se k membráně. Potenciál vázat se lze vystihnout afinitou a množstvím adsorbovaných AMP na lipidové membráně lze jednoduše popsat pomocí rozdělovací rovnováhy.

K popisu distribuce peptidů na rozhraní membrána:vodní fáze se používá rozdělovací konstanta K_p . K určení této konstanty se užívají různé metody, např. UV-Vis absorpční spektrofotometrie, fluorescenční spektroskopie a též měření Zeta potenciálu [31].

K popisu afinity AMP k membráně se užívá následující model: předpokládá se, že peptid (P) má n ekvivalentních a nezávislých vazných míst pro substrát, tj. lipid L. To popisuje rovnice



která ve tvaru kinetické rovnice zní

$$k_{\text{on}}[\text{L}][\text{P}] = k_{\text{off}}[\text{PLn}], \quad (1.14)$$

kde k_{on} a k_{off} jsou asociační, resp. disociační rychlostní konstanty. Informaci o afinitě AMP pak získáme porovnáním různých složení lipidů [31].

1.3.2 Struktura AMP

AMP obecně obsahují méně než 100 aminokyselinových zbytků. Jedná se většinou o L-aminokyseliny (jako glycin, leucin, arginine a histidin [31]), ale AMP mohou též obsahovat modifikace v podobě disulfidových můstků. Běžně mají kladný náboj (od +4 do +6) kvůli argininovým či lysinovým zbytkům, které interagují s negativně nabitými fosfátovými hlavičkami bakteriální membrány. Též obsahují hydrofobní část, a proto mají amfipatický charakter. Kladně nabitě AMP však nemají velký účinek proti bakteriím, které si vytvořili příslušnou rezistenci, proto vedle kladných AMP existují i záporně nabitě AMP (od -1 do -7) (např. chromacin) [30]. Předpokládá se však, že mají jinou primární biologickou funkci.

AMP lze klasifikovat do 4 skupin dle jejich sekundární struktury. První skupina zahrnuje lineární, α -helikální peptidy (melitin, dermcidin), druhá skupina pak peptidy s β -strukturami spojené dvěma či více disulfidovými můstky, třetí zahrnuje AMP s intermolekulárními disulfidovými můstky tvořícími smyčky a poslední skupina jsou peptidy se speciálními nebo modifikovanými aminokyselinami [30].

1.3.3 Interakce AMP s membránou

Pro interakci AMP s membránou je důležitá určitá, tzv. prahová koncentrace, která je podmínkou jejich účinků. Antimikrobiální peptidy nemusí působit pouze tím, že by vytvářely póry v membráně; mohou již indukovat některé změny membránovou permeabilizací. Příkladem je tzv. „carpet“ model [32, 33, 34]. V tomto modelu jsou AMP absorbované na povrchu membrány podobně jako detergenty, a tím ovlivňují architekturu membrány. Nejdříve se uplatňují elektrostatické interakce a jakmile se dosáhne prahové koncentrace na povrchu membrány, peptidy jej pokryjí a vytvoří vrstvu, které se říká „carpet“ („koberec“). Membrána se tak destabilizuje a dezintegruje. Příkladem takových AMP jsou aurein 1.2 a cecropin P1 [30].

Pro charakterizování interakcí AMP s různými modely membrán a předpovězení antimikrobiálních či cytotoxických působků se užívají rozdělovací a disociační konstanta,

zmíněné v 1.3.1. Známými mechanismy jsou tvorba pórů v membráně a tvorba „carpet“ povrchu. Různý charakter peptidů vede k různým mechanismům narušení membrán. Uplatňují se však i další faktory, např. poměr lipidů k peptidům a cílové místo zásahu na membráně [35].

Prvním krokem v mechanismu narušení membrány je navázání AMP na vnější stranu fosfolipidové membrány. Při nízkém poměru lipid:peptid se většina α -helikálních AMP váže rovnoběžně s membránou. Například cecropin P1 se váže tímto způsobem [35]. Byl vysloven názor, že taková vazba vyvolává konvexní zakřivení membrány, zvětšení povrchu vnější strany membrány, zeslabení tloušťky hydrofobního jádra a ztenčení lipidové dvojvrstvy [36, 37, 38].

Pomocí experimentálních metod jako NMR a rentgenové difrakční analýzy bylo zjištěno, že peptid vázající se na povrch membrány snižuje organizovanost fosfolipidových acylových řetězců (což může být odrazem ztenčení membrány) [35].

Změny ve fyzikálních vlastnostech lipidové dvojvrstvy způsobené vazbou peptidů, kterou podporuje další penetraci AMP, vedou k tvorbě transmembránových pórů. Při jejich tvorbě se AMP též váží nejdříve rovnoběžně s povrchem dvojvrstvy. Když koncentrace peptidů dosáhne prahové hodnoty, AMP, již navázané na membráně, se přeorientují a penetrují do hydrofobního jádra dvojvrstvy, čímž se vytváří transmembránový pór. Toto bylo poprvé popsáno v [39].

1.3.4 Využití počítačových simulací ke studiu interakcí AMP

Počítačové simulace dokáží zprostředkovat informace ohledně interakcí peptid-membrána. Kupříkladu molekulární dynamika (MD) a Monte Carlo metody poskytly detailní simulací chování jednotlivých molekul biofyzikální popis systému peptid-membrána [30]. MD simulace numericky řeší soustavy diferenciálních pohybových rovnic, které popisují dynamický vývoj systémů obsahujících velký počet částic. Poměrně přesná počítačová reprodukce vývoje systému vyžaduje použití velice krátkých (časových) simulačních kroků.

Simulovanými systémy jsou např. peptid-lipidová membrána, kdy se zkoumá např. chování AMP na rozhraní voda-dvojvrstva [40], nebo penetrace do membrány [41].

1.4 Počítačové modelování membrán

Lipidové membrány byly a jsou stále velmi intenzivně studovány teoretiky. Teoretické zkoumání lze provádět pomocí mean-field teorie či simulováním systému po jednotlivých molekulách (například molekulární dynamika (MD)).

1.4.1 Molekulární dynamika: Zhrubené modely

Ve „zhrubených“ modelech látek (angl. coarse grained model) simulované částice (angl. bead) nepředstavují jednotlivé atomy, nýbrž celé skupiny atomů (molekuly nebo části vysokomolekulárních komplexů). Potenciální energie systému se uvažuje ve tvaru

$$V = V_{\text{vazeb}} + V_{\text{úhel}} + V_{\text{dihedral}} + V_{\text{torze}} + V_{\text{vdW}} + V_{\text{el}}, \quad (1.15)$$

kde V_{vazeb} a $V_{\text{úhel}}$ jsou potenciální energie oscilací kolem rovnovážných hodnot délek a vazeb, V_{dihedral} a V_{torze} jsou potenciální energie oscilací vazebných ploch a V_{vdW} , V_{el} jsou potenciální energie van der Waalových vazeb a elektrostatická potenciální energie [21].

1.4.2 Disipativní částicová dynamika

Disipativní částicová dynamika⁵ (DPD) je stochastická simulační metoda, která je vhodná pro modelování takových systémů, které se skládají z velkého počtu částic a molekul. Jelikož DPD pracuje s tzv. „zhrubeným modelem“ látek, umožňuje tato metoda provádět dostatečně dlouhé simulace.

Disipativní částicová dynamika spadá do metod molekulární dynamiky (MD), která využívá k výpočtu trajektorií všech částic Newtonovy pohybové rovnice:

$$\frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i}, \quad (1.16)$$

kde \mathbf{r}_i je polohový vektor i -té částice, m_i hmotnost i -té částice, \mathbf{F}_i je celková síla působící na i -tou částici. Rovnicí (1.16) se tedy řídí časový vývoj daného systému. Celková síla vystupující v této rovnici je dána součtem síly konzervativní, \mathbf{F}^C , disipativní, \mathbf{F}^D a náhodné, \mathbf{F}^R :

$$\mathbf{F}_i = \sum_{i \neq j} (\mathbf{F}_{ij}^C + \mathbf{F}_{ij}^D + \mathbf{F}_{ij}^R). \quad (1.17)$$

⁵Zakladatelé této metody jsou P. Hoogerbrugge a J. Koelman [42, 43].

Konzervativní síla je nazvána podle toho, že ji lze vyjádřit jako záporný gradient „zhrubeneho“ potenciálu U^{CG} [44], tj.

$$\mathbf{F}^C = -\nabla_r U^{CG}. \quad (1.18)$$

Lze ji vyjádřit ve tvaru [45]

$$F_{ij}^C = \begin{cases} a_{ij} \left(1 - \frac{r_{ij}}{r_c}\right) & \text{pro } r_{ij} < r_c \\ 0 & \text{pro } r_{ij} \geq r_c \end{cases} \quad (1.19)$$

kde a_{ij} je repulzní koeficient mezi částicemi i a j , r_{ij} je vzdálenost mezi částicemi i a j , r_c je „cut-off“ (dosah konzervativní síly), jehož hodnota je většinou stejná pro všechny simulované částice. Potenciál v rovnici (1.19) bývá označován jako tzv. měkký potenciál, protože umožňuje vzájemné prostupování částic. Je tedy konzervativní síla měkkou repulzivní silou, to znamená, že interaguje slabě.

Disipativní síla (představující frikční sílu) a síla náhodná charakterizující vzájemné působení částic ve zhrubeném modelu (vliv prostředí). Disipativní síla závisí jednak na vzdálenosti částic i a j , jednak na vzájemné rychlosti:

$$\mathbf{F}_{ij}^D = -\gamma_{ij} w^D(r_{ij}) (\mathbf{e}_{ij} \cdot \mathbf{v}_{ij}) \mathbf{e}_{ij}, \quad (1.20)$$

kde γ_{ij} je koeficient disipativní síly, w^D je váhová funkce disipativní síly závislá na r_{ij} , rychlost $\mathbf{v}_{ij} = \mathbf{v}_i - \mathbf{v}_j$ a \mathbf{e}_{ij} je jednotkový vektor.

Naproti tomu síla náhodná nezávisí na rychlosti a je dána vztahem

$$\mathbf{F}_{ij}^R = \sigma_{ij} w^R(r_{ij}) \zeta_{ij} \frac{\mathbf{e}_{ij}}{\sqrt{\Delta t}}, \quad (1.21)$$

kde σ_{ij} je koeficient náhodné síly, w^R je váhová funkce náhodné síly závislá na r_{ij} , ζ_{ij} je Gaussovo náhodné číslo s jednotkovým rozptylem a nulovou střední hodnotou. Pro Gaussovo číslo platí, že $\zeta_{ij} = \zeta_{ji}$ a jeho hodnota je určena nezávisle pro každou dvojici částic i a j . Jednotkový vektor je značen \mathbf{e}_{ij} a Δt je časový krok. Výhodou DPD je, že popisuje správně hydrodynamické interakce mezi částicemi, protože všechny síly v rovnici (1.17) splňují 3. Newtonův zákon.

Váhové funkce w^D a w^R nelze volit zcela náhodně. Espanol a Warren [46] odvodili, že DPD simulace poskytují Maxwell-Boltzmannovu distribuci rychlostí částic a konstantní teplotu simulovaného systému, pokud váhové funkce splňují následující (tzv. flukтуаčně-

disipační teorém) podmínky:

$$\sigma_{ij}^2 = 2\gamma_{ij}k_B T \quad (1.22)$$

$$w^D(r_{ij}) = [w^R(r_{ij})]^2, \quad (1.23)$$

Disipativní a náhodná síla mají funkci termostatu. V simulacích, prováděných v této práci, byl použit tzv. NVT soubor, což je Gibbsův kanonický soubor, pro který je charakteristické, že počet částic N , objem systému V a teplota T je konstantní.

Řešení Newtonových pohybových rovnic se opíralo o Verletův algoritmus:

$$\begin{aligned} \mathbf{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) &= \mathbf{v}(t) + \frac{\mathbf{F}(t)}{2m}\Delta t, \\ \mathbf{r}(t + \Delta t) &= \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)\Delta t, \\ \mathbf{F}(t + \Delta t) &= \mathbf{F}\left(\mathbf{r}(t + \Delta t), \mathbf{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)\right), \\ \mathbf{v}(t + \Delta t) &= \mathbf{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\mathbf{F}(t + \Delta t)}{2m}\Delta t. \end{aligned} \quad (1.24)$$

1.4.3 Elektrostatika v DPD

Elektrostatické síly jsou síly dlouhého dosahu, tudíž typický simulační box není dost velký. Je nutno vzít v úvahu periodické okrajové podmínky.

Budiž dáno N částic, každá popsána polohovým vektorem \mathbf{r}_i a nábojem q_i v kubickém simulačním boxu s periodickými okrajovými podmínkami o délce hrany L a objemu $V = L^3$. Celková elektrostatická energie systému U^{el} je dána vztahem

$$U^{\text{el}} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \sum_i \sum_{j \geq i} \sum_{\mathbf{n}} \frac{q_i q_j}{|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}L|}, \quad (1.25)$$

kde ϵ_0 je dielektrická konstanta, ϵ_r permitivita prostředí, $\mathbf{n} = (n_x, n_y, n_z)$, je celočíselný vektor a pro $i = j$ je $\mathbf{n} = 0$ [47]. V sumaci přes \mathbf{n} se uvažují periodické okrajové podmínky.

K výpočtu dalekodosaových interakcí se používá obvykle Ewaldova sumace. Tato metoda vyjadřuje pravou stranu rovnice (1.25) pomocí dvou členů – reálnou prostorovou

sumou a reciprokou prostorovou sumou [47]:

$$U^{\text{el}}(\mathbf{r}_i^N) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \left(\sum_i \sum_{j>i} q_i q_j \frac{\text{erfc}(\alpha r_{ij})}{r_{ij}} + \frac{2\pi}{V} \sum_{\mathbf{k}\neq 0} Q(k) S(\mathbf{k}) S(-\mathbf{k}) - \frac{\alpha}{\sqrt{\pi}} \sum_i^N q_i^2 \right), \quad (1.26)$$

kde

$$Q(k) = \frac{1}{k^2} \exp\left(-\frac{k^2}{4\alpha^2}\right), \quad S(k) = \sum_{i=1}^N q_i \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_i), \quad \mathbf{k} = \frac{2\pi}{L} \mathbf{m}, \quad (1.27)$$

kde erfc je komplementární chybová funkce, α je parametr ovlivňující konvergenci v Ewaldově sumě, k je velikost vektoru \mathbf{k} a $\mathbf{m} = (m_x, m_y, m_z)$ je celočíselný vektor.

Reálná suma je počítána jako každá jiná krátkodosahová síla, kdežto pro výpočet dalekodosahových sil se používá Fourierova transformace.

Vzhledem ke skutečnosti, že DPD částice se mohou navzájem prostupovat a Coulombův zákon diverguje pro $r = 0$, není možné pracovat s bodovými náboji. V DPD simulacích se částice „rozmaže“ v určitém objemu [44].

V provedených simulacích byla použita Slaterova distribuce náboje [47]:

$$\rho_c = \frac{1}{\pi\lambda_e^3} \exp\left(-\frac{2r}{\lambda_e}\right), \quad (1.28)$$

kde λ_e je Slaterova rozpadová délka (decay length) náboje.

Interakční potenciál mezi dvěma nabitými částicemi i a j je pak dán aproximačním vztahem:

$$U_{ij}^{\text{el}} = \frac{l_B q_i q_j}{r_{ij}} [1 - (1 + \beta r_{ij}) \exp(-2\beta r_{ij})], \quad (1.29)$$

kde $\beta = 5/(8\lambda_e)$ a l_B je Bjerrumova délka [44].

Záporně vzatý gradient potenciálu z rovnice (1.29) dává sílu mezi dvěma nabitými částicemi i a j [47]:

$$F_{ij}^{\text{el}} = \frac{l_B q_i q_j}{r_{ij}^2} \{1 - \exp(-2\beta r_{ij}) [1 + 2\beta r_{ij} (1 + \beta r_{ij})]\}, \quad (1.30)$$

Tímto se odstraní singularita v Coulombově zákonu a obě veličiny (potenciál i síla) jsou pro $r = 0$ konečné.

1.4.4 Redukované jednotky

Místo klasických jednotek SI se v simulacích používají tzv. redukované jednotky. V této práci byly použity jednotky, které jsou běžné v DPD simulacích. Konkrétně jednotkou délky je dosah konzervativní síly r_c , jednotkou hmotnosti je hmotnost jedné DPD částice m_i , energie je měřená v jednotkách $k_B T$.

Pro výpočet reálného času simulace byl použit vztah, odvozený v [48]:

$$t_0 = (14, 1 \pm 0, 1) N_m^{5/3} [\text{ps}], \quad (1.31)$$

kde t_0 je časová jednotka a N_m je počet molekul rozpouštědla v jedné DPD částici. Reálný simulační čas se pak získá vynásobením t_0 celkovým počtem simulovaných kroků.

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo pomocí počítačových simulací ověřit mechanismus antibakteriálního působení relativně krátkých peptidů navržený v práci [3]: násobně nabitý peptid vytěsňuje od membrány dvojmocné kationty, které jsou potřebné pro správnou funkci membrány, a sám se elektrostaticky naváže na membránu, čímž efektivně zabraňuje interakci dvojmocných kationtů s povrchem membrány. Navazujícím cílem bylo studium působení přidaného peptidu za různých podmínek. Počítačové simulace poskytují experimentálně těžké dostupné (či vůbec nedostupné) informace, které umožňují lepší porozumění mechanismům studovaných procesů a dovolují relativně rychlé parametrické studie trendů chování a mohou tak částečně nahradit drahé experimenty.

3 Výsledky

Simulace byly prováděny metodou DPD (viz 1.4.2) pomocí programu DL_MESO, který vytvořil Michael Seaton [49]. Výstupy ze simulací byly zpracovávány pomocí programů, které napsal Mgr. Karel Šindelka, PhD. a jsou dostupné na adrese <https://github.com/KaGaSi/AnalysisTools/releases> (byla použita verze 3.2-2).

3.1 Použitý model a jeho ověření

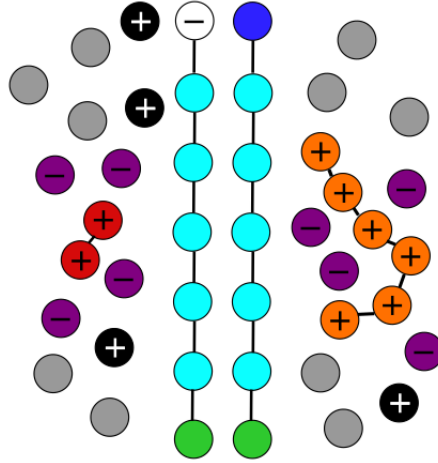
Model studované membrány je označen jako HC₅K, kde H je hydrofilní hlavička lipidu, C hydrofobní tělo (řetězce mastných kyselin) a K označuje koncovou částici mastných kyselin (sloužilo k vizualizaci prostředí membrány). Obr. 3.1 na str. 35 ukazuje schematicky model HC₅K, dvojmocného kationtu, peptidu a ostatních iontů. V experimentální práci [3] byly použity analoga betapeptidů, náš „zhruběný“ model je ale obecný. Tato práce umožňuje studovat interakci jakýchkoli kladně nabitých peptidů. V každém studovaném systému byla zachována celková elektroneutralita.

Kladně a záporně nabití protiionty jsou označeny Q_p , resp. Q_n , dvojmocný kation je označen M a je vytvořen ze dvou částic rozpouštědla, mezi nimiž je vazba o vysoké tuhosti $k = 250$ zajišťující těsnou lokalizaci. Peptid je označen P a sestává ze 6 částic, mezi nimiž byla vazba o tuhosti $k = 528$. Rovnovážná vzdálenost mezi dvěma „beadami“ byla $r_0 = 0.5$. Tabulka 3.1 na str. 36 přehledně shrnuje popis a vlastnosti simulovaných částic.

3.1.1 Použitá metoda a parametry

Pro simulaci membrány HC₅K byly použity parametry¹ z [50] (viz Tab. 3.2, str. 36), objem simulačního boxu byl ve všech provedených simulacích $V = 32^3$.

¹Hodnota $a_{ij} = 25$ je standardní hodnota repulzního koeficientu pro částice se stejnou rozpustností, jak ji stanovili tuto hodnotu Groot a Warren [45] na základě kompresibility vody. Odpuzování je charakterizováno vyššími hodnotami a_{ij} než 25. Pro částice, které jsou k sobě přitahovány jsou naopak hodnoty a_{ij} menší než 25.



Obrázek 3.1: Modelová struktura lipidní molekuly, dvojmocného kationtu, peptidu, protiiontů a rozpouštědla v DPD simulacích. Modrá barva reprezentuje hydrofilní hlavičku lipidu, bílá záporně nabitou hlavičku lipidu, tyrkysová řetězce mastných kyselin, zelená barva koncovou částici řetězce mastných kyselin, červená barva kladně nabitý dvojmocný kation, oranžová kladně nabitý peptid. Šedá značí rozpouštědlo, fialová, resp. černá záporné, resp. kladné protiionty. Barvy odpovídají barvám křivek v grafech, není-li uvedeno jinak.

Tyto parametry byly užity proto, aby membrána měla zejména vhodnou elasticitu a laterální tlak, což odpovídá reálným systémům. Tyto vlastnosti byly v práci [50] vzaty v úvahu. Na Obr. 3.2 je znázorněno námi reprodukováné rozložení jednotlivých komponent elektricky neutrálního systému studovaného v práci [50]. Křivky ukazující hustoty jednotlivých částic ve směru kolmém na samovolně vzniklou rovnovážnou membránu dobře reprodukuje publikovaná data (Obr. 2 (a) a (b) v [50]).

Po ověření správnosti používané metodiky (softwaru a nastavených parametrů) zreprodukováním publikovaných výsledků [50] bylo pokračováno ve vlastní práci. Zekvilibrovaná membrána byla modifikována tím, že část lipidových hlaviček (10 %) byla nabitá jednotkovým záporným nábojem [19]. Obr. 3.3a ukazuje, že nabitě hlavičky (označené bíle, pro lepší viditelnost zvětšeny) jsou rozmístěny náhodně na jedné straně při kolmém pohledu na membránu. Na Obr. 3.3b jsou vykresleny hustotní profily nabitých částic v tomto systému. Je vidět, že počet nabitých hlaviček je na obou stranách membrány stejný a distribuce hlaviček je symetrická. Tato simulace odpovídala reálnému čase 19 μ s.

Tabulka 3.1: Přehled simulovaných částic

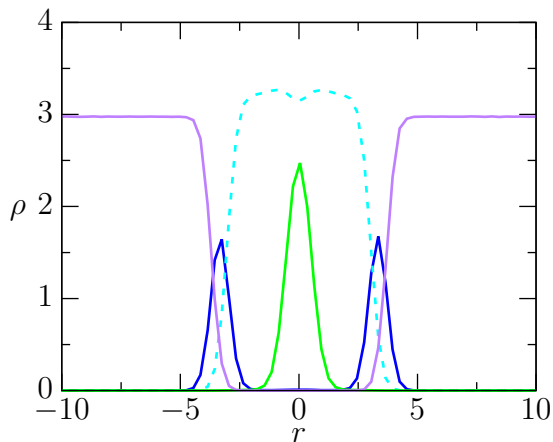
Částice	Popis	Náboj
H	hlavička lipidů	$q = -1$
C	řetězce mastných kyselin	—
K	koncová částice řetězce mastných kyselin	—
M	částice tvořící dvojmocný kation	$q = +2$
P	částice tvořící peptid	$q = +6$
Q_p	kladný protiiont	$q = +1$
Q_n	záporný protiiont	$q = -1$
H_q	nabitá hlavička lipidu	$q = -1$
S	částice rozpouštědla	—

Tabulka 3.2: Interakční parametry pro simulaci membrány HC₅K

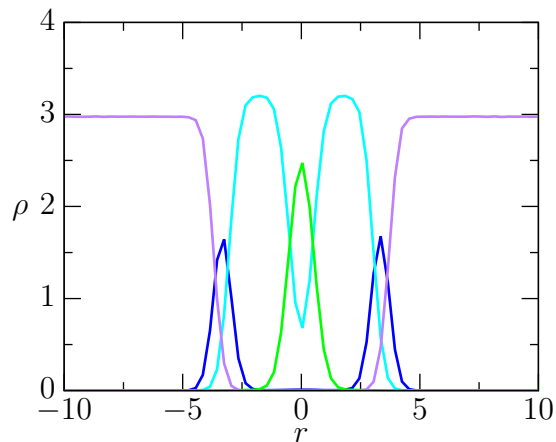
Dvojice částic	a_{ij}	γ_{ij}	k	r_0
HH	25	4.5	128	0.5
CC	25	4.5	128	0.5
SS	25	4.5	0	0
HS	35	4.5	0	0
HC	50	9.0	128	0.5
HK	50	9.0	128	0.5
CS	75	20.0	0	0

Studie pokračovala simulacemi, ve kterých byly k ekvilibrované nabitě membráně přidávány dvojmocné kationty s odpovídajícím množstvím protiiontů tak, aby se zachovala elektroneutralita systému. Pro přehlednost a orientaci v simulovaných systémech slouží Tab. 3.3.

Pro další zjednodušení je dále v textu použito značení $xM+yP$, kde $x = 25, 50, 100, 150, 200, 250$ a $y = 0, 16, 32$. Smyslem volby různého množství dvojmocného kationtu a různého množství peptidu bylo zkoumání vzájemného působení peptidů a dvojmocným kationtům a též získání informací ohledně interakce těchto peptidů s povrchem membrány. Krom toho byla pozornost zaměřena i na chování protiiontů (každý systém byl vždy jako celek elektroneutralní).



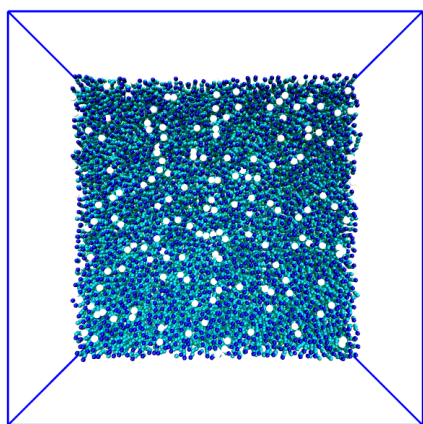
(a) Hustotní profily „bead“ tvořících membránu HC₅K ukazující součet profilů C+K



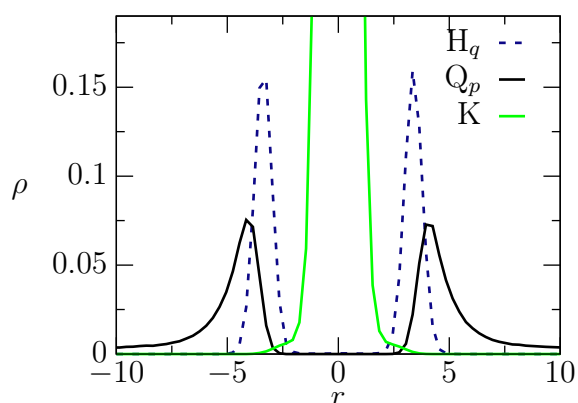
(b) Hustotní profily „bead“ tvořících membránu HC₅K

Obrázek 3.2: Závislost hustoty „bead“, ρ , na vzdálenosti, r , od středu elektricky neutrální membrány. Lipidová hlavička (H) - modrá, řetězce mastných kyselin (C) - tyrkysová plná, řetězce mastných kyselin (C+K) - tyrkysová čárkovaná, koncová částice mastných kyselin (K) - zelená, rozpouštědlo (S) - fialová.

Celkový počet molekul lipidů tvořících membránu HC₅K byl 3324.



(a) Náhodně rozmístěné nabitě hlavičky lipidů po povrchu membrány.



(b) Hustotní profily H_q , Q_p a K v nabitě membrány HC₅K.

Obrázek 3.3: Kolmý pohled na membránu (Obr. 3.3a) ukazuje, že rozložení nábojů na povrchu membrány je nahodilé. Hustotní profily uvedené na Obr. 3.3b dokazují, že náboje jsou stejnoměrně rozloženy po obou stranách membrány.

3.1.2 Nabitá membrána v roztoku s dvojmocnými kationty

Pro tento zkoumaný systém byla vytvořena série simulací, kdy se k nabitě lipidové membráně přidalo nejdříve 25, pak 50, 100, 200 a konečně 250 M. Použité interakční parametry

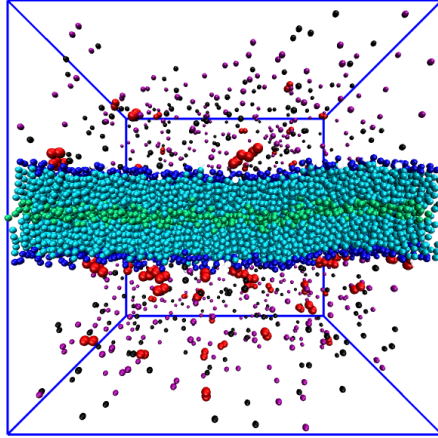
Tabulka 3.3: Značení simulovaných systémů

Označení systému	Počet dvojmocných kationtů (M)	Počet peptidů
nabitá HC ₅ K	0	0
25M+0P	25	0
25M+16P	25	16
50M+0P	50	0
50M+16P	50	16
50M+32P	50	32
50M+32P+50M	100	32
100M+32P	100	32
M100+0P	100	0
M100+16P	100	16
M100+32P	100	32
M150+0P	150	0
M150+16P	150	16
M150+32P	150	32
M200+0P	200	0
M250+0P	250	0

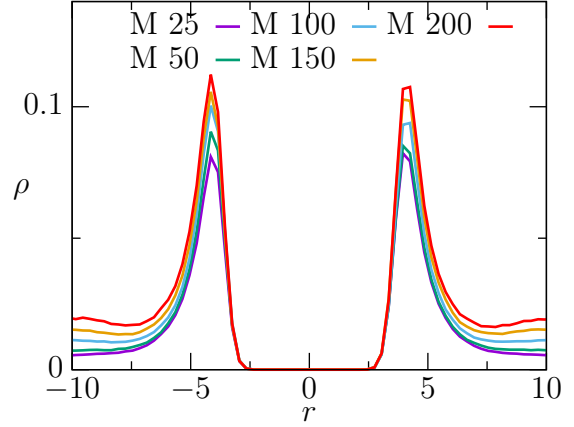
ukazuje Tab. 3.4. Na Obr. 3.4a je náhled simulačního boxu znázorňující membránu vytvořenou v systému obsahujícím 100 kladných dvojmocných kationtů M. Obr. 3.4b znázorňuje hustotní profily jednotlivých komponent ve směru kolmém na membránu. Na Obr. 3.5 jsou hustotní profily nabitých složek a nábojové hustotní profily pro systém 150M+0P.

Tabulka 3.4: Interakční parametry pro systémy HC₅K s M a B

a_{ij}/γ_{ij}	H, H _q	C, K	M	B	S, Q _p , Q _n
H, H _q	25/4.5	50/9.0	35/4.5	25/4.5	35/4.5
C, K		25/4.5	75/20.0	27/4.5	75/20.0
M			25/4.5	25/4.5	25/4.5
B				25/4.5	25/4.5
S, Q _p , Q _n					25/4.5

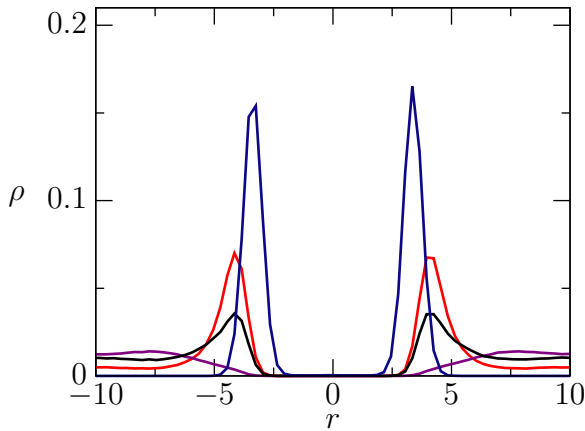


(a) Membrána s dvojmocnými kationty (červená, zvětšené)

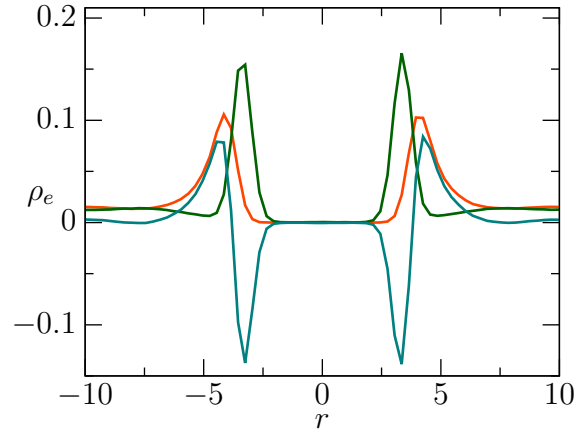


(b) Celkový kladný náboj v systému $xM+0P$ ($x = 25, 50, 100, 150$)

Obrázek 3.4: (a) Náhled ze strany na obsah simulačního boxu a (b) hustotní profily celkového kladného náboje v systému se 25 (fialová), 50 (zelená), 100 (modrá), 150 (oranžová) a 200 (červená) dvojmocnými kationty.



(a) Hustotní profily nabitých složek v systému $150M+0P$.

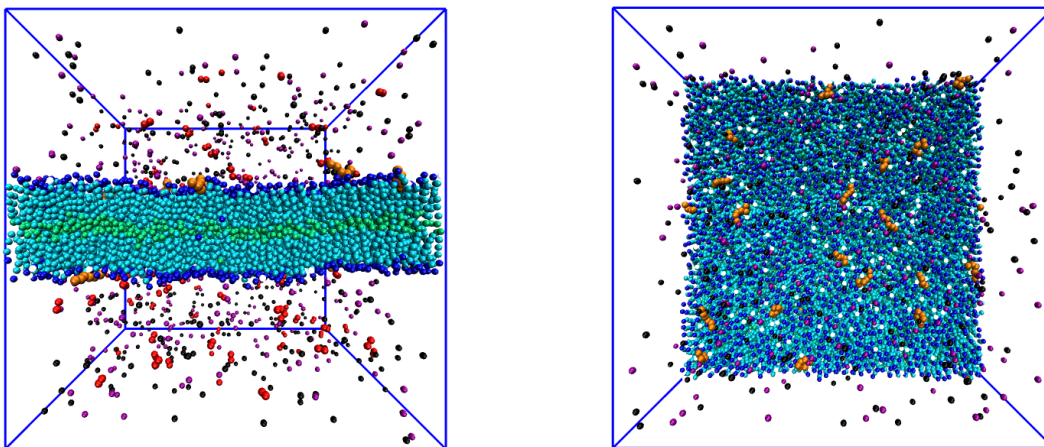


(b) Nábojové hustotní profily pro systém $150M+0P$.

Obrázek 3.5: (a) hustotní profily, ρ , nabitých bead (M červeně, Q_p fialově, H_q modře a Q_n černě) a (b) nábojové hustotní profily, ρ_e , celkového kladného náboje (M+ Q_p oranžově), celkového záporného náboje (H_q+Q_n zeleně). Celkový náboj ($H_q+M+Q_p+Q_n$ zelemodře) má pro větší názornost pro celkový záporný náboj hodnotu menší než nula.

3.1.3 Nabitá membrána v roztoku s dvojmocnými kationty a peptidy

Po ekvilibraci nabité membrány s dvojmocnými kationty bylo přidáno 16 a 32 peptidů a odpovídající počet protiiontů tak, aby byl systém elektroneutralní. Obr. 3.6 ukazuje peptidy, které se převážně zdržují při povrchu nabité membrány. Dvojmocné kationty



(a) Membrána s kationty (červená, zvětšené) a peptidy (oranžová, zvětšené). (b) Stejný systém – pohled shora. Kationty nejsou zobrazeny pro přehlednost.

Obrázek 3.6: Snapshoty ukazující chování peptidů (počet 32 na obou) vůči kationtům a membráně.

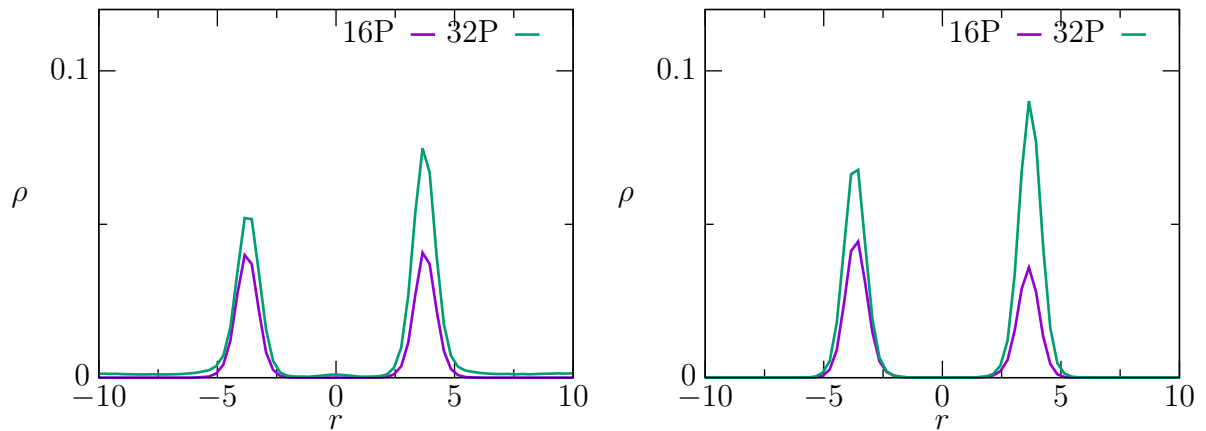
nejsou v obrázku zobrazeny jednak kvůli přehlednosti, jednak kvůli tomu, že klíčovou strukturou byl peptid, jehož rozmístění v simulačním boxu byl hlavní cíl tohoto obrázku.

Byly studovány následující závislosti:

1. změny v systému o konstantním počtu dvojmocných kationtů a s různým počtem peptidů (systém $100(50)M+yP$, kde $y = 0, 16, 32$),
2. vliv rostoucího množství dvojmocných kationtů při konstantním počtu peptidů (systém $xM+16P$, kde $x = 25, 50, 100, 150, 200$).
3. vliv postupu při „míchání“ na stav systému (systémy $M50+32P+50M$ a $M100+32P$).

Byl studován systém $100/50M+yP$ ($y = 16, 32$). K zekvilibrované nabité membráně se $100/50$ dvojmocnými kationty bylo pak přidáno 16 peptidů a posléze dalších 16 peptidů (celkový počet se zvýšil na 32 peptidů) a opět příslušné množství protiiontů, aby se zachovala elektroneutralita systému). Srovnání výsledků pro 100 a 50 kationtů ukazuje Obr. 3.7.

1. Membrána v roztoku s konstantním počtem dvojmocný kationtů a různým počtem peptidů

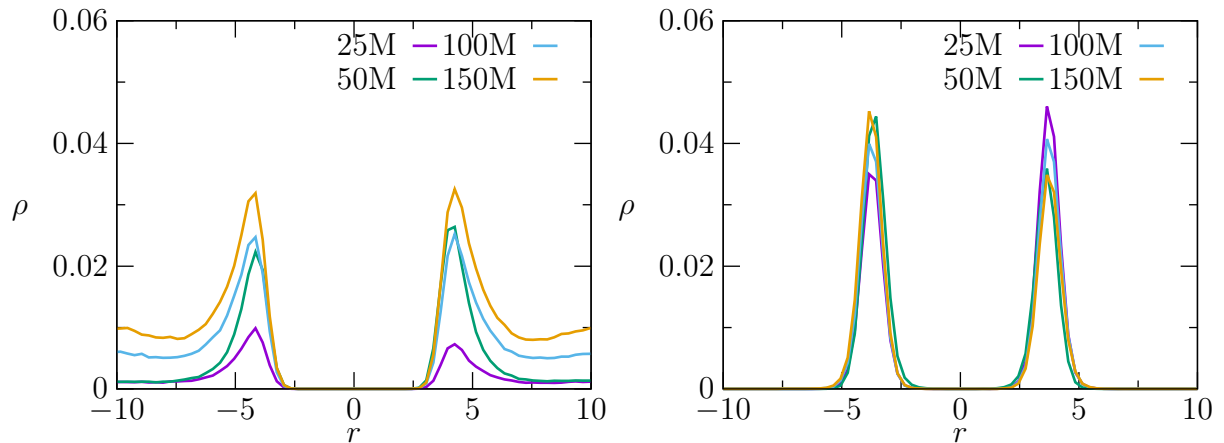


(a) Hustotní profily ukazující rozložení 16 peptidů (fialová) a 32 peptidů (zelená) kolem membrány v simulačním boxu obsahujícím 50 dvojmocných kationtů.

(b) Hustotní profily ukazující rozložení 16 peptidů (fialová) a 32 peptidů (zelená) kolem membrány v simulačním boxu obsahujícím 100 dvojmocných kationtů.

Obrázek 3.7: (a) hustotní profily peptidů kolem membrány s 50/100 kationty a (b) s 100/50 kationty.

2. Vliv různého počtu dvojmocných kationtů při konstantním počtu peptidů



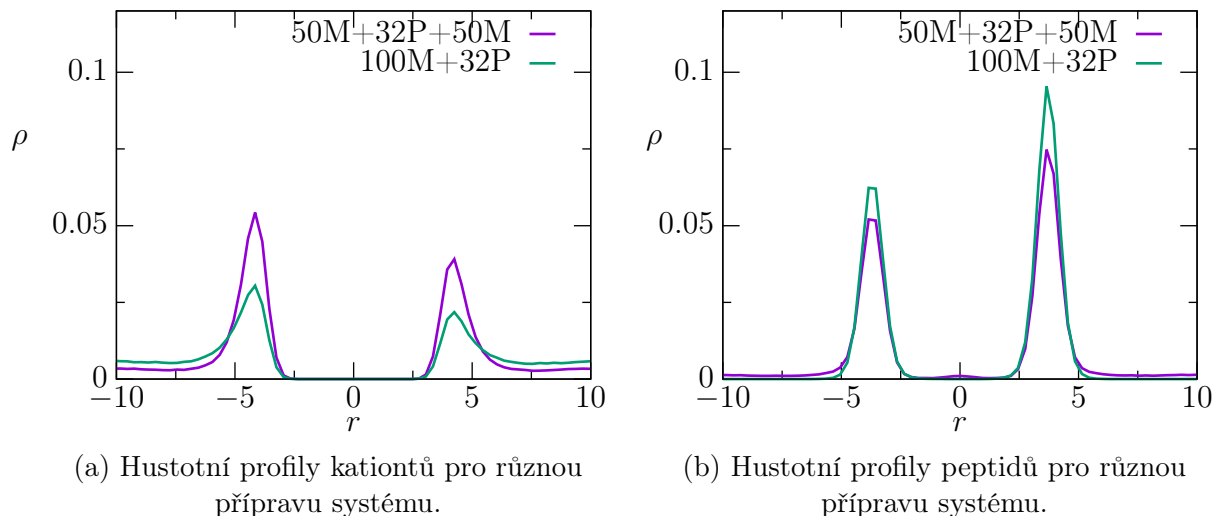
(a) Hustotní profily dvojmocných kationtů.

(b) Hustotní profily peptidů.

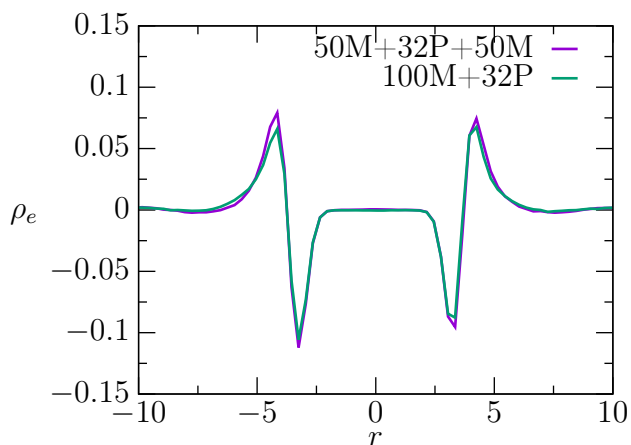
Obrázek 3.8: Hustotní profily (a) kationtů a (b) peptidů v systém tvořeném membránou, 16 peptidy a 25 (fialová), 50 (zelená), 100 (modrá) a 150 (oranžová) kationty. Změny hustotních profilů různého počtu dvojmocných kationtů a konstatního počtu peptidů při rostoucím počtu kationtů.

3. Vliv pořadí na přidávání složek

Na závěr byl zkoumán vliv přípravy systému na rozložení kationtů a peptidů. Systém obsahující 100 kationtů a 32 peptidů byl získán jednak přidáním 50 kationtů a 32 peptidů a pak ještě dalších 50 kationtů a jednak byl vytvořen přidáním 100 kationtů k membráně najednou a pak bylo přidáno 32 peptidů.



Obrázek 3.9: Hustotní profily (a) kationtů a (b) peptidů v systémech 50M+32P+50M (fialová) a 100M+32P (zelená).



Obrázek 3.10: Hustotní profil celkového náboje pro systém 50M+32P+150M (fialová) a 100M+32P (zelená).

4 Diskuze

Model bakteriální membrány tvořené HC₅K řetízky, reprezentujícími fosfolipidové molekuly, byl studován pomocí počítačových DPD simulací s parametry převzatými z práce [50], které autoři nastavili tak, aby vlastnosti simulované membrány (laterální tlak, elasticita) odpovídaly experimentálním měřením. Ověřil jsem, že moje simulace s použitými parametry dobře reprodukuje výsledky práce [50] i experimentální měření [51], neboť mnou simulovaná nenabitá membrána vykazuje stejné hustotní profily (polohy a výšky píků) jako membrána popsána v [50].

Dále jsem studoval chování takto získané rovnovážné (pečlivě ekvilibrované) membrány v simulačním boxu obsahujícím různá množství dvojmocných kationtů (M^{2+}) a kladně nabitých modelových peptidů (P_6). Simulovaná část membrány, která reprezentuje záporně nabitě ostrůvky bakteriální membrány nacházející se v blízkosti obou pólů buněčného dělení, byla modifikovaná nabitím 10% všech fosfolipidových hlaviček H (tj. 332 hlaviček) záporným nábojem. Na jednotlivé strany membrány byl náhodně rozmístěn vždy poloviční náboj. Nabitá membrána byla opět plně ekvilibrována. Ekvilibrace nabitých systémů je mnohem pomalejší než systémů elektricky neutrálních. Čím více nábojů N_q je přítomno v simulačním boxu, tím je ekvibrace náročnější, protože elektrostatické síly mají dlouhý dosah a do výpočtu je nutno zahrnout mnoho párových interakcí, jejichž počet stoupá s N_q^2 . Vzhledem k omezené kapacitě MetaCentra a vysoké vytíženosti tamních počítačů jsem často dlouho čekal ve frontě na spuštění simulací a ne všude jsem se statistikou simulačních dat spokojen. Přesto moje dosažené výsledky jasně ukazují základní trendy chování studovaného systému, které diskutuji v další části. Zde bych chtěl podotknout, že vlastní membrána (a to i v případě jejího částečného elektrického nabití) je v naprosto rovnovážném stavu a výsledky naznačují, že je dostatečně robustní a její struktura není ovlivněna interakcí s přidávanými komponentami. To znamená, že pouze při simulacích vlivu přídatku dalších komponent jsem v MetaCentru nezískal dostatečný výpočetní čas na dokonalou ekvibraci některých dat, jak již výše bylo uvedeno. Simulace však stále pokračují a doufám, že při obhajobě budu mít k dispozici lepší výsledky s dostatečně malými statistickými chybami.

Obr. 3.4b prezentující hustotní profily různého množství dvojmocných kationtů u nabitě membrány bez přidání peptidů (P_6) jasně dokazuje, že vzdor poměrně vysokému počtu center elektrostatické interakce na membráně je efekt lokalizace dvojmocných kationtů v těsném sousedství membrány omezen. Při zvyšování koncentrace dvojmocných kationtů vzrůstá hodnota hustoty v maximu jen mírně a většina kationtů se rozpouští v roztoku. Hlavním důvodem je princip maxima translační entropie iontů, který je znám ze studia syntetických i biologických polyelektrolytů, surfaktantů a dalších elektricky nabitých vysokomolekulárních systémů [52, 53].

Obr. 3.5, na kterém jsou znázorněny hustotní profily nabitých částic (nabitě hlavičky, dvojmocné kationty a kladně i záporně nabitě protiionty) a příslušné nábojové hustoty, ukazuje, že většina dvojmocných iontů se nachází na vnější straně membrány (směrem do roztoku), a tak na obou rozhraních vzniká elektrostatický potenciál. Hustotní profily fosfolipidových řetězců a nenabitých i nabitých fosfolipidových hlaviček (není ukázáno) jsou pro všechny systémy studované v této práci stejné, tj. struktura membrány nebyla ovlivněna při našich simulacích ani přidáváním kationtů, ani peptidů (P_6).

K rovnovážným membránám s různými počty kationtů byly dále přidávány peptidy (P_6). Zde bychom chtěli zdůraznit, že přitom došlo k dalšímu zvýšení časové náročnosti ekvibrace systému. Při pokračování v simulaci, která již byla zatížena určitou statistickou chybou, se opět zvýšil počet nabitých částic systému, čímž se kvadraticky zvýšil počet párů, mezi nimiž bylo nutné explicitně vypočítat příspěvek k celkové elektrostatické interakci.

Obr. 3.7 demonstruje vliv koncentrace dvojmocných kationtů na interakci peptidů s membránou. Obsahuje simulační data pro dvě nezávisle přidaná množství peptidu ve dvou elektroneutrálních systémech lišících se koncentrací dvojmocných iontů. Píky obou křivek (jak pro 16, tak pro 32 peptidů) na obou stranách membrány sice nejsou ve stejné výšce, což je způsobeno nedostatečnou ekvibrací systému, přesto však jsou základní trendy chování naprosto zřejmé. Je vidět, že vzrůstající koncentrace dvojmocných kationtů mírně omezuje navazování peptidů. Omezení je pouze malé a to ze dvou důvodů: Za prvé, peptidy jsou násobně nabitě, větší síla a kooperativní působení nábojů umístěných na jejich řetězcích zesiluje atraktivní interakci a za druhé, na rozdíl od malých iontů je jejich hmotnost vyšší a translační entropie při jejich uvolnění do roztoku nepřispívá tak významně ke snížení Gibbsovy energie jako u malých a velice pohyblivých iontů [52].

Obr. 3.8 ukazuje jaký vliv má přídavek peptidů na distribuci dvojmocných kationtů kolem membrány, tj. objasňuje efekt, který byl primárním cílem experimentálního studia autorů práce [3], která sloužila jako motivace této studie. Srovnání obr. 3.8a s 3.4b naznačuje, že navázání peptidů a jejich elektrostatická interakce s nabitými fosfátovými

skupinami na povrchu membrány poměrně silně vytěsňuje dvojmocné kationty do roztoku a znesnadňuje jejich přístup k záporně nabitým ostrůvkům bakteriální membrány. Srovnání křivek ukazuje, že vytěšňovací efekt je významný zejména při nízkých koncentracích dvojmocných kationtů a klesá s jejich vzrůstající koncentrací. Toto zjištění podporuje hypotézu, že studovaný efekt je významný i za fyziologických podmínek, či za podmínek, které autoři experimentální studie použili pro svůj výzkum. Toto pozorování lze, opět jako v předchozím případě, vysvětlit dnes již obecně přijímaným (učebnicovým) popisem chování polyelektrolytů a obdobných elektricky nabitých vysokomolekulárních nanočástic, či dalších nanostruktur a entropickým efektem jejich protiiontů ve vodných (popř. jiných silně polárních) rozpouštědlech.

V poslední části studia, bylo na systému tvořeném membránou, 100 dvojmocnými kationty a 32 peptidy ukázáno, že výsledné rozložení kationtů a peptidů kolem membrány zřejmě závisí také na způsobu přípravy systému. U systému “50M+32P+50M” je v důsledku vytěšňovacího efektu v těsném sousedství membrány více peptidů (P_6) a méně dvojmocných kationtů než u systému “100M+32P”. Vzhledem k tomu, že se struktura membrány neměnila a že záporný náboj je dán především kladně nabitými hlavičkami, které se neposunuly, jsou změny celkového rozložení náboje mezi oběma systémy (i v rámci našich statistických chyb a ne úplně optimálního dosažení rovnováhy) statisticky významné.

Závěrem lze shrnout, že naše počítačová studie potvrzuje závěry autorů práce [3], kteří připisují potlačení bakteriální aktivity gramnegativních bakterií přidáním krátkých peptidů a jejich syntetických analogů nebo jejich inkubací s biokompatibilními polymerními povrchy modifikovanými betapeptidy či jejich analogy nepřímému entropickému efektu uvolnění dvojmocných kationtů Ca^{2+} a Mg^{2+} (jejichž přítomnost na vnějším povrchu membrány je nutná pro funkci bakterií) do roztoku. Simulace rovněž potvrzují publikované závěry, že se jedná o kompetitivní vytěšňování, kdy přidavkem nadbytku dvojmocných kationtů se aktivita bakterií opět zvýší a kdy přidavek ionty-vázajícího činidla (chelátu) má naopak antibakteriální účinek.

5 Závěr

Prvním cílem práce bylo pomocí DPD simulace modelu neutrální HC₅K membrány ověřit správnost použitého algoritmu a všech provedených simulací. Tento cíl byl beze zbytku splněn. Mnou nasimulovaná membrána s parametry převzatými z práce [50] dobře odpovídá publikovaným simulačním datům. Hustotní profily všech komponent (H, C a K) tvořících membránu vykazují stejné výšky a polohy maxim píků jako již publikovaná data.

Hlavním cílem práce bylo studium chování nabitě membrány v roztoku s dvojmocnými kationty a kladně nabitými peptidy a potvrzení či vyvrácení hypotézy publikované v experimentální práci [3], že antimikrobiální působení krátkých a kladně nabitých peptidů je hlavně výsledkem nahrazení elektrostatických interakcí mezi dvojmocnými kationty a záporně nabitými fosfátovými skupinami na povrchu membrány silnějšími kooperativními interakcemi s vícenásobně kladně nabitými peptidy a následného uvolnění kationtů (nezbytně nutných pro funkci bakterií) do roztoku, což je navíc silně podporováno zvýšením translační entropie těchto pohyblivých iontů. I tento cíl byl splněn a pracovní hypotéza autorů experimentální studie byla potvrzena.

Všechny pozorované změny v rozložení jednotlivých složek kolem membrány lze vysvětlit na základě teorie chování polyelektrolytů a dalších elektricky nabitých nanočástic a jejich protiontů ve vodných roztocích.

Simulace vzniku jak nenabitě, tak i nabitě membrány a vytvoření jejich rovnovážných struktur bylo v simulacích plně dosaženo. Při studiu interakce membrány s přidávanými ionty a peptidy nebyly pozorovány žádné významné změny struktury, což je v souladu s obecnými experimentálními poznatky o chování biologických membrán.

Při simulacích změn rozložení přidávaných komponent jsem bohužel v MetaCentru nezískal dostatek simulačního času, takže některá data nejsou úplně ekvilibrována, nicméně základní trendy chování systému jsou přesto zcela zřejmé. Simulace pokračují a doufám, že při obhajobě ukážu simulační data s podstatně lepší statistikou.

Literatura

- [1] D. Ciumac, H. Gong, X. Hu, and J. R. Lu, “Membrane targeting cationic antimicrobial peptides,” *Journal of colloid and interface science*, vol. 537, pp. 163–185, 2019.
- [2] A. R. Statz, J. P. Park, N. P. Chongsiriwatana, A. E. Barron, and P. B. Messersmith, “Surface-immobilised antimicrobial peptoids,” *Biofouling*, vol. 24, no. 6, pp. 439–448, 2008.
- [3] Y. Qian, F. Qi, Q. Chen, Q. Zhang, Z. Qiao, S. Zhang, T. Wei, Q. Yu, S. Yu, Z. Mao, *et al.*, “Surface modified with a host defense peptide-mimicking β -peptide polymer kills bacteria on contact with high efficacy,” *ACS applied materials & interfaces*, vol. 10, no. 18, pp. 15395–15400, 2018.
- [4] Z. Vodrážka and J. Krechl, *Bioorganická chemie*. Státní nakladatelství technické literatury, 1991.
- [5] J. M. Willey, L. Sherwood, C. J. Woolverton, *et al.*, *Prescott’s principles of microbiology*. McGraw-Hill Higher Education Boston (MA), 2009.
- [6] A. Romanovský, *Obecná biologie*. Státní pedagogické nakladatelství, 1988.
- [7] R. Murray, D. Granner, P. Mayes, and V. Rodwell, “Harperova biochemie, 23. vyd,” *Praha: H&H*, 1998.
- [8] J. P. Sáenz, D. Grosser, A. S. Bradley, T. J. Lagny, O. Lavrynenko, M. Broda, and K. Simons, “Hopanoids as functional analogues of cholesterol in bacterial membranes,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 38, pp. 11971–11976, 2015.
- [9] J. R. Scott and T. C. Barnett, “Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 60, pp. 397–423, 2006.

- [10] J. H. Pollack, Neuhaus, and C. Francis, "Changes in wall teichoic acid during the rod-sphere transition of bacillus subtilis 168.," *Journal of bacteriology*, vol. 176, no. 23, pp. 7252–7259, 1994.
- [11] M. Luckey, *Membrane structural biology: with biochemical and biophysical foundations*. Cambridge University Press, 2014.
- [12] G. M. Clore and J. Iwahara, "Theory, practice, and applications of paramagnetic relaxation enhancement for the characterization of transient low-population states of biological macromolecules and their complexes," *Chemical reviews*, vol. 109, no. 9, pp. 4108–4139, 2009.
- [13] W. M. O’Leary, "The fatty acids of bacteria," *Bacteriological reviews*, vol. 26, no. 4, p. 421, 1962.
- [14] H. Keweloh and H. J. Heipieper, "Trans unsaturated fatty acids in bacteria," *Lipids*, vol. 31, no. 2, pp. 129–137, 1996.
- [15] Z. Šípál, *Biochemie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1992.
- [16] C. Nielsen, "Lipid-protein interactions in biomembranes," *Handbook of Molecular Biophysics*, pp. 329–358, 2009.
- [17] A. Whited and A. Johs, "The interactions of peripheral membrane proteins with biological membranes," *Chemistry and physics of lipids*, vol. 192, pp. 51–59, 2015.
- [18] D. Argudo, N. P. Bethel, F. V. Marcoline, and M. Grabe, "Continuum descriptions of membranes and their interaction with proteins: towards chemically accurate models," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1858, no. 7, pp. 1619–1634, 2016.
- [19] E. Mileykovskaya, A. C. Ryan, X. Mo, C.-C. Lin, K. I. Khalaf, W. Dowhan, and T. A. Garrett, "Phosphatidic acid and n-acylphosphatidylethanolamine form membrane domains in escherichia coli mutant lacking cardiolipin and phosphatidylglycerol," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 5, pp. 2990–3000, 2009.
- [20] A. Lee, "Lipid–protein interactions in biological membranes: a structural perspective," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1612, no. 1, pp. 1–40, 2003.

- [21] E. Alipour, D. Halverson, S. McWhirter, and G. C. Walker, “Phospholipid bilayers: stability and encapsulation of nanoparticles,” *Annual review of physical chemistry*, vol. 68, pp. 261–283, 2017.
- [22] C. Tanford, *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes 2d ed.* J. Wiley., 1980.
- [23] J. G. Davis, K. P. Gierszal, P. Wang, and D. Ben-Amotz, “Water structural transformation at molecular hydrophobic interfaces,” *Nature*, vol. 491, no. 7425, pp. 582–585, 2012.
- [24] J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, and B. W. Ninham, “Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers,” *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, vol. 72, pp. 1525–1568, 1976.
- [25] L. Maibaum, A. R. Dinner, and D. Chandler, “Micelle formation and the hydrophobic effect,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 108, no. 21, pp. 6778–6781, 2004.
- [26] S. J. Singer and G. L. Nicolson, “The fluid mosaic model of the structure of cell membranes,” *Science*, vol. 175, no. 4023, pp. 720–731, 1972.
- [27] F. Maršík and I. Dvořák, *Biodynamika*. Academia, 1998.
- [28] J. Horák, A. Kotyk, and K. Sigler, *Biochemie transportních pochodů*. Academia, 1984.
- [29] Z. Vodrážka, *Biochemie*. Academia, 2002.
- [30] F. G. Avcı, B. Sariyar Akbulut, and E. Ozkirimli, “Membrane active peptides and their biophysical characterization,” *Biomolecules*, vol. 8, no. 3, p. 77, 2018.
- [31] A. Hollmann, M. Martinez, P. Maturana, L. C. Semorile, and P. C. Maffia, “Anti-microbial peptides: interaction with model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics,” *Frontiers in chemistry*, vol. 6, p. 204, 2018.
- [32] N. Shagaghi, E. A. Palombo, A. H. Clayton, and M. Bhave, “Antimicrobial peptides: biochemical determinants of activity and biophysical techniques of elucidating their functionality,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 34, no. 4, p. 62, 2018.

- [33] T.-H. Lee, K. N. Hall, and M.-I. Aguilar, "Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure," *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 16, no. 1, pp. 25–39, 2016.
- [34] Y. Shai, "Mode of action of membrane active antimicrobial peptides," *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, vol. 66, no. 4, pp. 236–248, 2002.
- [35] H. Sato and J. B. Feix, "Peptide–membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1758, no. 9, pp. 1245–1256, 2006.
- [36] K. J. Hallock, D.-K. Lee, and A. Ramamoorthy, "Msi-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain," *Biophysical journal*, vol. 84, no. 5, pp. 3052–3060, 2003.
- [37] K. Matsuzaki, Y. Mitani, K.-y. Akada, O. Murase, S. Yoneyama, M. Zasloff, and K. Miyajima, "Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and pglA," *Biochemistry*, vol. 37, no. 43, pp. 15144–15153, 1998.
- [38] F.-Y. Chen, M.-T. Lee, and H. W. Huang, "Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation," *Biophysical journal*, vol. 84, no. 6, pp. 3751–3758, 2003.
- [39] G. Baumann and P. Mueller, "A molecular model of membrane excitability," *Journal of supramolecular structure*, vol. 2, no. 5-6, pp. 538–557, 1974.
- [40] M. Jafari, F. Mehrnejad, and F. Doustdar, "Insight into the interactions, residue snorkeling, and membrane disordering potency of a single antimicrobial peptide into different lipid bilayers," *PloS one*, vol. 12, no. 11, 2017.
- [41] J. P. Ulmschneider and M. B. Ulmschneider, "Molecular dynamics simulations are redefining our view of peptides interacting with biological membranes," *Accounts of chemical research*, vol. 51, no. 5, pp. 1106–1116, 2018.
- [42] P. Hoogerbrugge and J. Koelman, "Simulating microscopic hydrodynamic phenomena with dissipative particle dynamics," *EPL (Europhysics Letters)*, vol. 19, no. 3, p. 155, 1992.
- [43] J. Koelman and P. Hoogerbrugge, "Dynamic simulations of hard-sphere suspensions under steady shear," *EPL (Europhysics Letters)*, vol. 21, no. 3, p. 363, 1993.

- [44] K. Procházka, K. Šindelka, X. Wang, Z. Limpouchová, and M. Lísal, “Self-assembly and co-assembly of block polyelectrolytes in aqueous solutions. dissipative particle dynamics with explicit electrostatics,” *Molecular Physics*, vol. 114, no. 21, pp. 3077–3092, 2016.
- [45] R. D. Groot and P. B. Warren, “Dissipative particle dynamics: Bridging the gap between atomistic and mesoscopic simulation,” *The Journal of chemical physics*, vol. 107, no. 11, pp. 4423–4435, 1997.
- [46] P. Espanol and P. Warren, “Statistical mechanics of dissipative particle dynamics,” *EPL (Europhysics Letters)*, vol. 30, no. 4, p. 191, 1995.
- [47] M. González-Melchor, E. Mayoral, M. E. Velázquez, and J. Alejandre, “Electrostatic interactions in dissipative particle dynamics using the ewald sums,” *The Journal of chemical physics*, vol. 125, no. 22, p. 224107, 2006.
- [48] R. D. Groot and K. Rabone, “Mesoscopic simulation of cell membrane damage, morphology change and rupture by nonionic surfactants,” *Biophysical journal*, vol. 81, no. 2, pp. 725–736, 2001.
- [49] M. A. Seaton, R. L. Anderson, S. Metz, and W. Smith, “DI_meso: highly scalable mesoscale simulations,” *Molecular Simulation*, vol. 39, no. 10, pp. 796–821, 2013.
- [50] J. C. Shillcock and R. Lipowsky, “Equilibrium structure and lateral stress distribution of amphiphilic bilayers from dissipative particle dynamics simulations,” *The Journal of chemical physics*, vol. 117, no. 10, pp. 5048–5061, 2002.
- [51] K. Olbrich, W. Rawicz, D. Needham, and E. Evans, “Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers,” *Biophysical journal*, vol. 79, no. 1, pp. 321–327, 2000.
- [52] A. V. Dobrynin and M. Rubinstein, “Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces,” *Progress in Polymer Science*, vol. 30, no. 11, pp. 1049–1118, 2005.
- [53] A. V. Dobrynin, M. Rubinstein, and S. P. Obukhov, “Cascade of transitions of polyelectrolytes in poor solvents,” *Macromolecules*, vol. 29, no. 8, pp. 2974–2979, 1996.