

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. et Bc. Kamila Riedlová**

Zjišťování struktury pórotvorných kolicinů  
Determination of the structure of pore-forming colicins

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Radovan Fišer, Ph.D.  
Konzultanti: Dr. habil. Lukasz Cwiklik, Ph.D. & Dr. Pavel Majer

Praha, 2017

**Prohlášení:**

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

V Praze, 15. 08. 2017

Kamila Riedlová

Ráda bych poděkovala svému školiteli **RNDr. Radovanu Fišerovi, Ph.D.** za vedení této práce, jeho vstřícný přístup ke mně, seznámení s metodou měření na BLM, pomoc při sepisování práce a velmi vhodné připomínky.

**Dr. habil. Lukášovi Cwiklikovi, Ph.D.** za pravidelné zajištění finanční podpory projektu, poskytnutí přístupů k výpočetním strojům a skriptům nutných pro start simulace na počítačových klastrech, předání rad na jejich používání a vytvoření, pomoc při konzultaci výsledků a obětavou ochotou k okamžitému řešení jakýchkoliv problémů.

**Dr. Pavlu Majerovi a Mgr. Lence Monincové, Ph.D.** a ostatním členům jeho laboratoře za možnost si vyzkoušet organickou syntézu vlastníma rukama.

Dále **Mgr. Tereze Dolejšové** za seznámení s praktickými aspekty měření na BLM v Laboratoři fyziologie bakterií PřF UK.

Dále děkuji níže uvedeným institucím, bez kterých by tato práce také nemohla být vypracována, nebo alespoň ne v takovém rozsahu.



UNIVERZITA  
KARLOVA



ÚOCHB  
IOCB PRAGUE



Také děkuji za finanční podporu projektu Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK 390115).

## ***Abstrakt***

Cílem této práce bylo prozkoumat chování jednotlivých helixů z C-terminální pórtvorné domény (CTD) kolicinu U v lipidové membráně na atomární úrovni. K tomuto účelu byla využita metoda *all-atom* molekulových simulací (MD). Posléze byla práce rozšířena i na CTD publikovaných struktur dalších pórtvorných kolicinů. Na jejím základě se podařilo identifikovat u samostatných helixů H1 a H10 jejich schopnost narušit integritu lipidové membrány. Přičemž u helixu H1 po jeho provedené organické syntéze byla jeho aktivita experimentálně ověřena pomocí metody BLM. Ostatní helixy jsou většinou velmi krátké na to, aby se udržely samostatně napříč v membráně a jejich chování může být ještě více ovlivněné nepřirozenými konci, proto již syntetizovány nebyly. Z MD simulací dvojic po sobě jdoucích helixů vyplynulo, že jejich struktura nebo schopnost udržet se v membráně může velmi záviset na blízkých interakčních partnerech. Výsledky této práce odhalují důležitost helixu H10 CTD kolicinů pro stavbu póru, která se do této chvíle vůbec neuvažovala. Také podporují toroidní model stavby póru navržený pro kolicin E1. Z výsledků této práce vyplývá, že koliciny, tyto unikátní proteiny schopné výskytu v roztoku i v lipidové membráně, obsahují aminokyselinové sekvence s určitými sekundárními strukturami, které jsou i jako uměle separované od zbytku proteinu schopné narušit funkci vnitřní bakteriální membrány.

**Klíčová slova:** pórtvorné koliciny, topologie proteinů, interakce proteinu s membránou, simulace molekulové dynamiky

## ***Abstract***

This master's thesis provides study of individual helices from C-terminal pore-forming domain (CTD) of colicin U and their behavior in lipid bilayer on atomic level. For this purpose the all-atom molecular simulation method was used. Later the study was extended and applied on CTD of published structures of other pore-forming colicins. On the basis of study extension the ability of disruption of lipid bilayer integrity by helices H1 and H10 was successfully observed. Helix H1 was synthesized and its activity was experimentally proved on black lipid membranes. The other helices are often too short to be able to keep position in lipid bilayer and their behavior could be affected by artificial termini, therefore they were not synthesized. The MD simulations of pairs of helices show that structure stability and their ability to stay in the membrane depends on binding partners. The results of the thesis show the importance of H10 for colicin pore-formation, which has not been observed yet. The results also support the toroidal pore model suggested previously for colicin E1. The results prove that colicins contain specific secondary structures, which are able to disrupt the inner bacterial membrane not only in its native form but also when artificially separated from the rest of the protein.

**Klíčová slova:** Pore-Forming Colicins, Protein topology, Protein-Membrane Interaction, Molecular dynamics simulation

## SEZNAM ZKRATEK

AMK	aminokyselina
BS	buněčná stěna
BLM	černá lipidická membrána (z „black lipid membrane“)
CTD	C-terminální doména
CD	cirkulární dichroismus
FF	silové pole (z „force field“)
H1	1. helix C-terminální domény kolicinu, amfipatický
H2	2. helix C-terminální domény kolicinu, amfipatický
H3	3. helix C-terminální domény kolicinu, amfipatický
H4	4. helix C-terminální domény kolicinu, amfipatický
H5	5. helix C-terminální domény kolicinu, amfipatický
H6	6. helix C-terminální domény kolicinu, amfipatický
H7	7. helix C-terminální domény kolicinu, amfipatický
H8	8. helix C-terminální domény kolicinu, hydrofobní
H9	9. helix C-terminální domény kolicinu, hydrofobní
H10	10. helix C-terminální domény kolicinu, amfipatický
M-1	model C-terminální domény kolicinu U v solubilním stavu (iTasser)
MD	molekulová dynamika
MK	mastná kyselina
MSA	„Multiple sequence alignment“
NTD	N-terminální doména
PBC	periodické okrajové podmínky (z „periodic boundary conditions“)
PDB	Protein Data Bank
PK	pórotvorný kolicin
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
POPE	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
R-1	model č.1 C-terminální domény kolicinu U v membráně vygenerovaný softwarem Rosetta, který byl používán v práci
R-4	model č. 4 C-terminální domény kolicinu U v membráně vygenerovaný softwarem Rosetta, který byl používán v práci
RBD	receptorová doména (z „receptor binding domain“)
VDW	metoda zobrazení atomů van der Waals
VMD	program Visual Molecular Dynamics pro vizualizaci MD trajektorie

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Literární přehled</b>	<b>13</b>
2.1	Koliciny	13
2.2	CTD pórotvorných kolicinů	15
2.3	Struktury CTD PK v roztoku	16
2.3.1	CTD skupiny (A)	18
2.3.2	CTD skupiny (E1) a (Ia)	20
2.3.3	Kolicinu U a jeho CTD	22
2.4	Struktura CTD v lipidové membráně	22
2.5	Přehled využívaných metod ke studiu CTD	23
2.5.1	Experimentální studium pórotvorných proteinů	23
2.5.2	Teoretické studium PK	26
2.6	Struktura CTD při interakci s membránou	27
2.6.1	Model uzavřeného kanálu – „umbrella“	27
2.6.2	Model uzavřeného kanálu – „penknife“	28
2.6.3	Model uzavřeného kanálu kolicinu E1 pro rok 2017	29
2.6.4	Model otevřeného kanálu skupiny (A), (Ia) a (E1)	31
2.6.5	Toroidní model pro otevřený kanál skupiny (E1)	34
2.6.6	Oligomerizace monomerů CTD	35
<b>3</b>	<b>Cíle práce</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>Materiál a metoda</b>	<b>39</b>
4.1	Metoda MD simulací	39
4.1.1	Silové pole	40
4.1.2	Výpočetní algoritmus MD	46
4.1.3	Ostatní důležité parametry metody	49
4.1.4	Použitý software a hardware pro MD simulace	50
4.1.5	Vstupní souřadnice a silová pole	51
4.1.6	Parametry pro MD simulaci	58
4.1.7	Složení systému a jeho příprava pro simulaci	58
4.1.8	Analýzy trajektorií	60
4.2	Chemická syntéza krátkých peptidů na pevné fázi	64
4.2.1	Použití chránících skupin Fmoc a t-Boc v syntéze a coupling	65
4.2.2	Odštěpení peptidu z pevné fáze a „scavengery“	66
4.2.3	Vysrážení peptidu a jeho následná purifikace a analýza	68



4.2.4	Alternativní způsob přípravy peptidu.....	69
4.2.5	Použité přístroje a materiál.....	69
4.2.6	Postup chemické syntézy peptidu H1 kolicinu U a analýza .....	69
4.3	Měření na BLM.....	70
4.3.1	Postup pro měření pórotvorných vlastností H1 kolicinu U .....	71
4.3.2	Analýza pórotvorných vlastností .....	72
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>73</b>
5.1	Vložení peptidu do lipidové membrány pro MD simulace .....	73
5.2	Chování helixu H1 CTD kolicinu U v MD simulacích .....	75
5.3	Vlastnosti H1 ve vodě a v membráně POPC.....	76
5.3.1	Vizualizace chování H1 v POPC membráně a ve vodě.....	76
5.3.2	RMSD H1 v membráně POPC a ve vodě.....	81
5.3.3	Helicita H1 v membráně POPC.....	83
5.3.4	Sekundární struktura H1 v membráně POPC .....	84
5.3.5	RMSD, helicita a sekundární struktura H1 v čisté vodě s protiionty .....	86
5.3.6	Sklon H1 v membráně POPC .....	87
5.3.7	Hustotní profil H1 v membráně POPC.....	92
5.4	Srovnání vlastností H1 v membráně POPC a membráně mimikující E. coli .....	93
5.5	Srovnání chování H1 kolicinu U a H1 ostatních pórotvorných kolicinů.....	96
5.5.1	VMD snímky z trajektorie H1 ostatních PK v POPC .....	97
5.5.2	RMSD H1 ostatních PK v POPC membráně.....	99
5.5.3	Helicita H1 ostatních PK v POPC membráně .....	100
5.5.4	Sekundární struktura H1 ostatních PK v POPC membráně.....	102
5.5.5	Hustotní profil průniku vody do membrány POPC způsobený PK.....	103
5.5.6	Základní vlastností H1 ostatních PK v membráně POPC .....	104
5.5.7	Identifikace AMK zbytků H1 uplatňujících se v atrakci POPC hlaviček do středu lipidové membrány .....	105
5.5.7.1	Hustotní profil pro C $\alpha$ PK v membráně POPC .....	106
5.6	Chemická syntéza helixu H1 CTD kolicinu U a jeho purifikace .....	111
5.7	Chování H1 na BLM .....	115
5.8	Vlastnosti dalších peptidů CTD kolicinu U v MD simulacích .....	124
5.8.1	Přehled základních vlastností jednotlivých H2-H10 CTD kolicinu U .....	124
5.8.2	Chování jednotlivých helixů H2-H10 CTD kolicinu U v čisté vodě.....	124
5.8.2.1	Chování jednotlivých helixů H2-H10 při vertikálním vložení do POPC membrány	125
5.8.2.2	Chování jednotlivých helixů H2-H10 vložených horizontálně pod POPC hlavičky lipidové membrány .....	131

5.8.2.3	Chování jednotlivých helixů H2-H10 vložený doprostřed lipidové membrány.....	133
5.8.2.4	Srovnání chování H10 kolicinu při různém vložení do lipidové membrány.....	134
5.8.3	Chování vybraných dvojic peptidů CTD kolicinu U.....	137
5.8.3.1	H1-H2 (R-4).....	137
5.8.3.2	H2-H3 (R-4).....	139
5.8.3.3	H8-H9 (R-1).....	140
5.8.3.4	H9-H10 (M-1).....	141
5.8.4	Oligomerizace H1 v POPC membráně.....	142
5.8.5	Interakce zvolených peptidů CTD kolicinu U v membráně POPC.....	144
5.8.5.1	H1, H3, H5, H10.....	144
5.8.6	Chování segmentu CTD kolicinu U obsahujícího 4 helixy.....	145
5.8.6.1	H1-H2-H3-H4.....	146
5.8.6.2	H1-H2-H3-H4 – verze 2.....	147
5.8.6.3	H4-H5-H6-H7.....	148
5.8.6.4	H7-H8-H9-H10.....	151
5.9	Chování celé CTD kolicinu U a A ve vodě při 310 K.....	153
<b>6</b>	<b>Diskuze a závěr.....</b>	<b>155</b>
<b>6.1</b>	<b>Úloha H1 na stavbě póru.....</b>	<b>155</b>
<b>6.2</b>	<b>Oligomerizace H1 – teorie a experiment.....</b>	<b>157</b>
<b>6.3</b>	<b>Úloha H2, H3 na stavbě póru.....</b>	<b>157</b>
<b>6.4</b>	<b>Úloha H4, H6 a H5, H7 na stavbě póru.....</b>	<b>158</b>
<b>6.5</b>	<b>Hydrofobní vlásenka H8-H9.....</b>	<b>158</b>
<b>6.6</b>	<b>Úloha H10 na stavbě póru kolicinu H10.....</b>	<b>159</b>
<b>6.7</b>	<b>Dynamika póru a tloušťka lipidové membrány a další možnosti.....</b>	<b>160</b>
<b>6.8</b>	<b>Další výhled.....</b>	<b>160</b>
<b>7</b>	<b>Shrnutí.....</b>	<b>161</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury.....</b>	<b>163</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy.....</b>	<b>171</b>
9.1	Metoda MD simulací prakticky.....	171
9.2	Základní soubory nutné pro start MD simulace.....	171
9.2.1	Spuštění a výpočet MD simulace.....	176
9.3	Používání softwaru pro MD simulace krátkých peptidů v lipických membránách.....	177
9.3.1	Generování jednotlivých peptidů ze struktury celé CTD a FF.....	177
9.3.2	Příprava membrány POPE:POPG.....	180
9.3.3	Příprava solvovaného peptidu pro MD simulaci.....	181

9.3.4 Návod na vložení jednoho peptidu (ev. dvojic a trojic peptidů) nebo čtyř samostatných peptidů současně, či šesti samostatných peptidů po jednom) do lipidové membrány v Gromacsu182

# 1 Úvod

Koliciny jsou plazmidově kódované exotoxiny proteinové povahy produkované některými bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*. Jejich funkcí je zabít bakterie příbuzné produkčnímu kmeni a poskytnout mu tak jistou selekční výhodu, přičemž napadány mohou být všechny příbuzné druhy i kmeny postrádající odpovídající imunitní protein neutralizující účinek konkrétního toxinu. Vzhledem k tomu, že až 50 % kmenů *E. coli* vyskytujících se v lidském tlustém střevě je schopných produkovat nějaký typ kolicinu, jsou tyto toxiny zajímavé i pro farmaceutický průmysl. Lze na ně nahlížet jako na potenciální antimikrobiální léčiva s praktickým využitím v budoucnu. Dokud však ale nebude znám přesný mechanismus jejich účinku, lze jen stěží očekávat jejich reálné využití.

Koliciny mohou bakterie zabít DNAsovou a RNAsovou aktivitou, nebo i řízenou degradací buněčné stěny. Nejčastějším způsobem zabíjení je ale jejich cílový útok na vnitřní bakteriální membránu. Toxická funkce kolicinů v tomto případě spočívá ve vytvoření porů v membráně s následkem porušení přirozených membránových elektrochemických gradientů. Takto způsobená depolarizace membrány vede ke smrti bakteriální buňky.

Za všechny zmiňované toxigenní aktivity je zodpovědná C-terminální doména kolicinů (CTD), která vykazuje relativně velmi konzervované strukturní rysy a tím také předurčuje jednotlivé mechanismy působení kolicinu na bakteriální buňku. Naopak N-terminální a receptorová doména, které rovněž tvoří kostru kolicinu, zodpovídají za přenos toxinu přes vnější bakteriální membránu na místo účinku. Struktury některých pórotvorných CTD v solubilním stavu byly již experimentálně vyřešeny a deponovány do PDB, avšak přesná 3D struktura těchto domén v bakteriální membráně není zatím jednoznačně objasněná a prokázána. A jelikož struktura proteinu předurčuje i jeho funkci, dá se očekávat, že vyřešení struktury pórotvorné CTD v membráně přispěje i k objasnění mechanismu cytotoxického účinku samotného kolicinu.

V naší laboratoři se již věnujeme experimentálnímu studiu kolicinu U, a proto je na něj zaměřena i velká část mé práce. Avšak na rozdíl od probíhajícího výzkumu tohoto rekombinantně připraveného pórotvorného proteinu, je v této práci předkládána studie jednotlivých segmentů jeho C-terminální domény s využitím metod molekulové dynamiky (MD). Ve své práci jsem se především zaměřila na první úsek CTD a jeho reálné chování částečně ověřila pomocí chemické syntézy a metody měření na černých lipidických membránách (BLM).

Tento projekt v současnosti stále probíhá a v rámci své další práce plánuji ověřit chování chemicky syntetizovaných dalších částí CTD kolicinu U pomocí metody BLM. Tyto segmenty

budou navrženy z MD simulací vycházejících z této práce. Dále pomocí MD simulací s navázanou fluorescenční sondou (badanem), jejíž silové pole v současnosti připravujeme, bude ověřeno, zda nedochází k ovlivňování jejich chování v membráně. Výsledky z fluorescenčního měření takto syntetizovaných a značených „umělých peptidů“ budou následně vztaženy k pokusům probíhajícím na celém a také fluorescenčně značeném kolicinu U. Přepokládaným výsledkem bezprostředně navazujícím na tuto práci je objasnění topologie CTD kolicinu U v membráně a zároveň i detailního mechanismus jejího působení.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Koliciny

Jak již bylo zmíněno v úvodu, koliciny jsou toxiny a slouží jako nástroj vnitrodruhové i mezidruhové kompetice zvyšující fitness svého nositele - své produkční enterobakterie, obvykle *E. coli*. Geny pro jejich transkripci jsou kódovány na Col plazmidech a k jejich expresi obvykle dochází při stresových podmínkách po aktivaci SOS systému. Imunitu produkční bakterii proti jejímu vlastnímu toxinu uděluje specifický imunitní protein kódovaný na tom samém plazmidu. Jejich současnou transkripcí a translací je zajištěna dostatečná ochrana a nemůže tak po exportu toxinu do vnějšího okolí dojít k napadení bakterie jejím vlastním exotoxinem. Transport kolicinu ven z buňky je v některých případech ještě usnadněn současně produkovanými lytickými proteiny (Lakey a Slatin 2001, Parker a Feil 2005, Cascales et al. 2007).

Kromě jejich praktického potenciálu, který mají pro farmaceutický průmysl, je studium jejich funkce důležité i pro samotné pochopení funkce ostatních toxinů, neboť odrážejí jejich společný mechanismus - cílení, translokaci a zabíjení (Pattus et al. 1990, Lakey a Slatin 2001).

Stejně jako mnoho jiných toxinů, jsou i koliciny složeny ze strukturních domén a zpravidla obsahují tři (ev. čtyři v případě kolicinu S4, Arnold et al. 2009) funkční domény: N-terminální, receptorovou a C-terminální (Vetter et al. 1996). Tyto strukturní domény jsou na sobě částečně nezávislé a lze je proto studovat různými metodami samostatně jako jednotlivé celky.

N-koncová část (NTD) kolicinu zajišťuje jeho translokaci skrze buněčnou stěnu cílové gram-negativní bakterie do periplazmy. K translokaci do periplazmatického prostoru membrány koliciny využívají buď systém Ton-B nebo systém Tol-PaA. Proto jsou tyto domény také sekvenčně velmi konzervované - vždy musí obsahovat krátkou sekvenci aminokyselin, která je

specifická a nezbytná pro komunikaci s jedním nebo druhým proteinovým translokačním systémem (Cascales et al. 2007).

Receptorová část (RBD) je lokalizovaná mezi N-terminální a C-terminální doménou a zodpovídá za vazbu kolicinu na specifický receptor vnější membrány. U některých kolicinů je sekvenčně homologní, ale může být i jedinečná. Např. kolicinu S4 umožňuje navázání na receptor OmpW vnější bakteriální membrány, na který se již žádný další známý kolicin neváže. Proto není ani překvapením, že tato jeho doména, která se v proteinu vyskytuje dokonce ještě jednou jako duplikát, není sekvenčně homologní s centrálními doménami ostatních kolicinů (Arnold et al. 2009). Podle receptorové specifčnosti kolicinů nebo jimi využívaného translokačního systému pro vstup do cílové buňky, byla nakonec založena i jejich klasifikace. Koliciny se začaly obvykle klasifikovat a označovat velkými písmeny abecedy a později i číslíkovým indexem (Cascales et al. 2007).

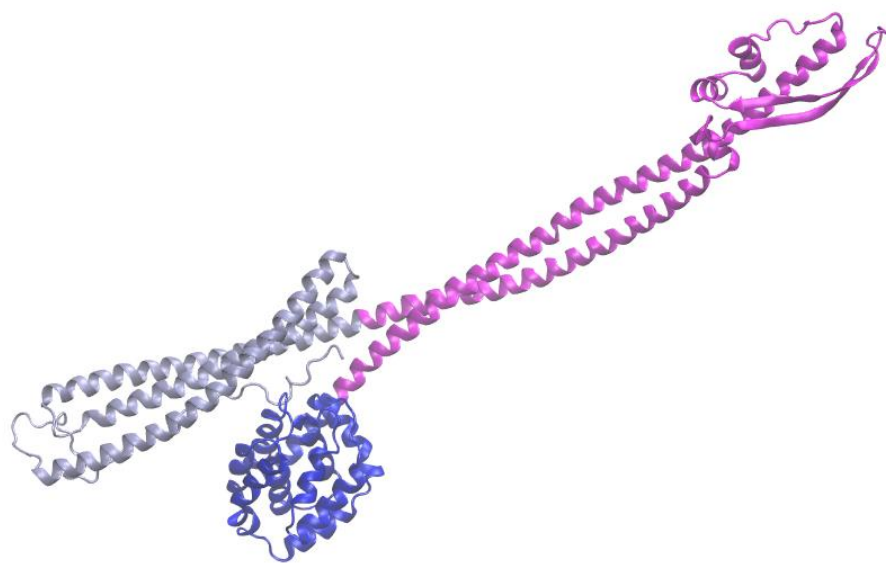
C-koncová část (CTD) pak vykonává vlastní cytotoxickou aktivitu kolicinu. Podle buněčné struktury, na kterou tyto domény působí, se dají koliciny funkčně rozdělit na několik typů:<sup>1</sup>

- koliciny degradující DNA (kolicin E2, E7, E8, E9)
- koliciny degradující rRNA (kolicin E3, E4, E6)
- koliciny degradující tRNA (kolicin D, E5)
- koliciny degradující buněčnou stěnu inhibicí její syntézy (kolicin M)
- koliciny degradující přirozené membránové gradienty (kolicin A, S4, B, U, N, E1, Ia, Ib, K...)

Všechny domény tvořící molekulu kolicinu jsou zobrazeny na Obr. 1. Z výše uvedených informací také vyplývá, jak koliciny účinkují na cílovou buňku: nejprve se specificky naváží na povrchový receptor vnější membrány, poté se translokují skrze BS a nakonec působí. Více podrobností se čtenář dozví např. v publikaci Cascales et al. z roku 2007, která do tohoto roku shrnuje prakticky veškeré podstatné poznatky o biologii kolicinů.

---

<sup>1</sup> Řazení kolicinů podle jejich funkce je převzato z informací dostupných v publikaci Cascales et al. 2007.



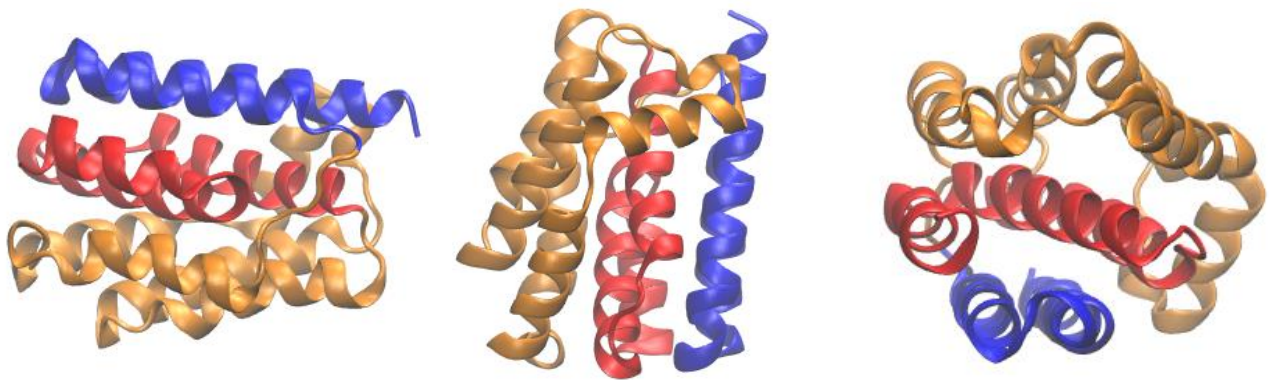
**Obr. 1:** Kolicin Ia (PDB ID: 1CII) stejně jako většina ostatních pórotvorných kolicinů se skládá ze tří domén: N-terminální domény (stříbrně), receptorové domény (růžově) a C-terminální domény (modře) zodpovědné za pórotvornou aktivitu kolicinu. Struktura byla zobrazena programem VMD.

## 2.2 CTD pórotvorných kolicinů

Jak již bylo dříve uvedeno, nejčastější cílovou strukturou, na kterou koliciny účinkují, je vnitřní membrána gramnegativních bakterií. Již roku 1983 bylo pro kolicin A ukázáno, že jeho samostatná CTD po izolaci od zbytku proteinu je schopná v lipidové membráně vytvořit pór (Martínez et al. 1983, Collarini et al. 1987), později se toto tvrzení rozšířilo na CTD všech kolicinů (Cascales et al. 2007). Po zabudování CTD tohoto pórotvorného kolicinu (PK) do membrány je vytvořený kanál závislý na membránovém elektrickém potenciálu – podle jeho hodnoty je buď v otevřeném nebo uzavřeném stavu. Pokud dojde k otevření zabudovaných kolicinových kanálů, pak také dochází k depolarizaci vnitřní membrány a následné inhibici funkcí spojených s transportem, včetně výroby energie (Pattus et al. 1990, Cascales et al. 2007). Jakou má tento kanál v membráně strukturu a k jakým strukturním změnám dochází při jeho otevírání a zavírání, není známo nebo doposud oficiálně vědecky přijato.

## 2.3 Struktury CTD PK v roztoku

CTD kolicinů jsou ve vodě dobře rozpustné v širokém rozmezí pH a zůstávají ve formě monomerů. Charakteristická kompaktní struktura CTD kolicinu, kterou zaujímá v roztoku, je zobrazena na Obr. 2. Je tvořena z těsně poskládaného svazku deseti  $\alpha$ -helixů uspořádaných ve třech rovinách (Pattus et al., 1990; Cascales et al., 2007). Rovina obsahující  $-NH_2$  terminál peptidu obsahuje pár antiparalelních amfipatických helixů (helix H1 a helix H2) a je propojena dlouhou smyčkou s další rovinou obsahující další dva páry antiparalelních amfipatických helixů (helix H3, helix H4 a helix H6, helix H7) propojené helixem (helix H5). Prostřední rovinu tvoří tři helixy (helix H8, helix H9, helix H10). Helix H10 je amfipatický. Helixy H8 a H9 jsou naopak vysoce hydrofobní a zaujímají motiv vlásenky, která je prakticky pohřbena uvnitř polární CTD (Pattus et al. 1990, Cascales et al. 2007).



**Obr. 2:** Kompaktní struktura CTD kolicinu A (PDB ID: 1COL). Struktura obsahuje ve třech rovinách 10  $\alpha$ -helixů. Hydrofobní jádro tvoří dva helixy H8 a H9 (červeně) a společně s helixem H10 (červeně) tvoří jednu ze tří rovin struktury. Další rovina obsahuje helixy H1 a H2 (modře), poslední pak dva páry helixů (H3, H4 a H6, H7) propojené helixem H5 (oranžově). Obrázek byl vytvořen programem VMD.

Jelikož je počet objevených PK už poměrně vysoký a může se stále ještě zvyšovat, zvyšuje se i snaha o jejich praktické rozřídění. I přesto, že jsou sekvence pórotvorných CTD vysoce homologní (Pattus et al. 1990), jak je ukázáno v Obr. 3 lze je prakticky rozdělit do tří skupin na základě srovnání jejich sekvencí a zároveň i jejich sekundárních struktur (Arnold et al. 2009). To

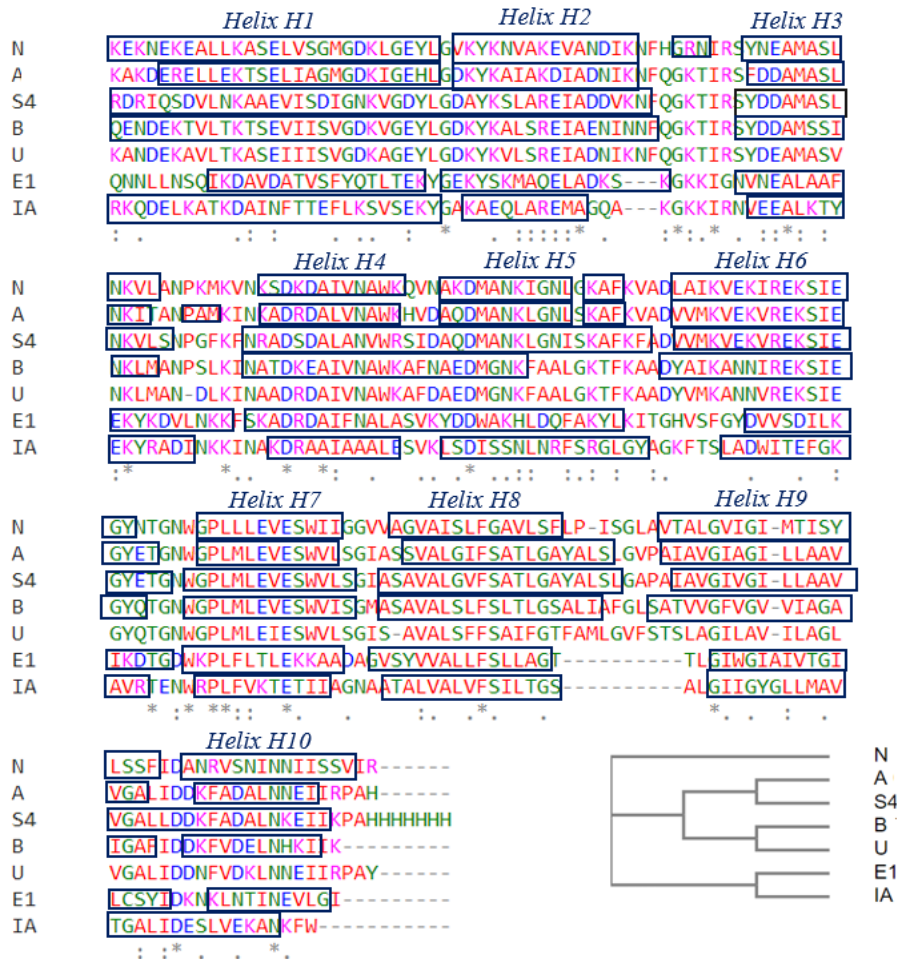


lze udělat, protože struktury CTD některých pórotvorných kolicinů (PK) v roztoku byly již vyřešeny a jsou dostupné v PDB. K datu 27.7.2017 byly publikovány struktury CTD v solubilním stavu pro PK: A, S4, B, N, E1 a Ia. Vlastnosti těchto uložených struktur jsou shrnuty v Tab. 1.

Přehled publikovaných struktur pórotvorných kolicinů v PDB							
Kolicin	PDB ID	Rozlišení metody	Řetězce	Délka	Domény:	Ident. k CTD A	Rok zveřejnění a autoři
<b>A</b>	1COL	2.4	A, B	204	CTD	100%	1992, Parker et al.
<b>S4</b>	3FEW	2.5	X	505	NTD, 2 RBD, CTD	77%	2009, Arnold et al.
<b>B</b>	1RH1	2.5	A	511	NTD, RBD, CTD	61%	2004, Hilsenbeck et al.
<b>N</b>	1A87	3.1	A	321	RBD, CTD	58%	1999, Vetter et al.
<b>E1</b>	2I88	2.5	A	191	CTD	33%	2006, Elkins et al.
<b>Ia</b>	1CII	3.0	A	602	NTD, RBD, CTD	28%	1998, Wiener et al.

**Tab. 1:** Shrnutí doposud publikovaných struktur PK, které jsou uloženy v PDB. Je zde uvedeno PDB ID struktury, pod kterým lze uvedenou strukturu v databázi najít a další informace o původu struktury. Všechny tyto koliciny jsou produkovány *E. coli* a jejich struktury byly získány rentgenovou krystalografií. Koliciny jsou seřazeny podle sekvenční podobnosti jejich CTD vzhledem k CTD kolicinu A. Výpočet sekvenční identity CTD byl proveden na stránkách <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (dostupné k 1.8.2017).

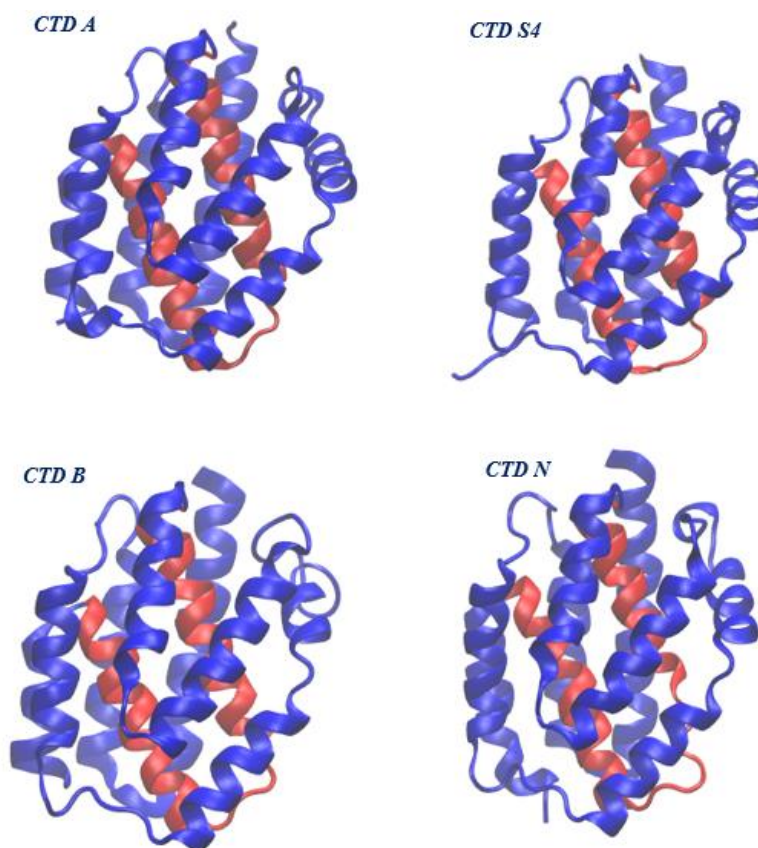
Podle porovnání sekvencí a sekundárních struktur CTD PK lze do první skupiny (A) zařadit koliciny A, B, N, S4 a U (jeho sekvenční podobnost s CTD A je 66 %), do druhé (E1) pak kolicin E1 a do třetí skupiny (Ia) kolicin Ia. Hlavní rozdíly mezi první skupinou (A) a ostatními skupinami pórotvorných domén spočívají jednak v délce čtyř helixů (H1, H3, H4 a H8) C-terminální domény, a jednak ve způsobu ohybu oblasti mezi hydrofobními helixy (H8 a H9) a úhlu mezi helixem H1 a H2. Rozdíly mezi skupinou (E1) a (Ia) jsou založené spíše na bodových mutacích a čtyřech detekovatelných krátkých  $\beta$ -struktur skupiny Ia (Arnold et al. 2009).



**Obr. 3:** Porovnání sekvencí publikovaných CTD PK (PDB ID: 1COL, 1RH1, 1A87, 3FEW, 2I88, 1CII) a kolicinu U z Uniprot (O24681). Sekvenční porovnání bylo provedeno pomocí Clustal OMEGA dostupného na adrese: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> k 27.7.2017 a graficky upravené. Zvýrazněny jsou AMK, které jsou v solubilním stavu helikální. Určení AMK sekvence odpovídající helixům vychází z hlavičky publikovaného PDB souboru dané struktury.

### 2.3.1 CTD skupiny (A)

Do této skupiny CTD patří koliciny A, S4, B, U a N. Jejich CTD jsou porovnány na Obr. 4 s výjimkou CTD kolicinu U, jehož CTD nebyla zatím experimentálně vyřešena. Pórotvorné vlastnosti těchto domén jsou pojednány v samostatné kapitole č. 2.5.1.1. Kromě těchto publikovaných struktur CTD lze do této skupiny přiřadit i jiné koliciny na základě sekvenčního srovnání a s doposud nevyřešenou terciární strukturou. Těmi se však v této práci nezabývám, a proto zde uvedeny nejsou.



**Obr. 4:** CTD skupiny (A) jsou tvořeny 10  $\alpha$ -helixy. Dva hydrofobní helixy H8 a H9 (červeně) jsou obklopeny osmi amfifilními helixy H1 – H7 a H10 (modře). Struktury pocházejí z PDB (1COL, 3FEW, 1RH1, 1A87) a k jejich zobrazení byl použit program VMD.

Trojrozměrná struktura **CTD kolicinu A (1COL)** byla poprvé publikována 1992 Parkerem et al. Jedná se o nejvíce zkoumanou CTD napříč všemi koliciny vůbec. Obsahuje 197 AMK reziduí a 1478 atomů. Vyskytuje se v ní 270 donorů a 283 akceptorů H-vazeb.

Trojrozměrná struktura **CTD kolicinu S4 (3FEW)** byla vyřešena Arnoldem et al. roku 2009. Tato publikovaná struktura obsahuje chybu v residuu GLU410, které obsahuje informace pouze o jeho pěti atomech místo devíti. Chybí mu definice pro atomy CG, CD, OE1 a OE2. Struktura obsahuje 200 AMK, 1 522 atomů.

Trojrozměrná struktura **CTD kolicinu B (1RH1)** byla poprvé publikována roku 2004, Hilsenbeckem et al. Této publikované struktuře chybí u LYS511 definice pro poslední atomy (OC2, aj.). Tato struktura (bez LYS511) obsahuje 196 AMK zbytků s 1485 atomy, 272 donorů a 289 akceptorů vodíku, celkově 362 H-vazeb.

Trojrozměrná struktura **CTD kolicinu N (1A87)** byla poprvé zveřejněna Vetterem et al. roku 1999. Jedná se o kompletní strukturu CTD PK získanou s nejvyšším rozlišením experimentální metody. Obsahuje 199 residuí, 1512 atomů, 284 donorů a 281 akceptorů vodíku, celkem 393 H-vazeb.

Praktické shrnutí dalších informací o těchto CTD pro navazující teoretickou práci je uvedeno v Tabulce 2. Informace strukturách byly získány Gromacsovým nástrojem *pdb2gmx*.

CTD skupiny (A)				
CTD / PDB ID	Residua CTD	<i>n</i> AMK v CTD	Celková váha[a. m. u]	Celkový náboj CTD [e]
A / 1COL	ALA5 – ARG201	197	21054	-3
S4 / 3FEW	ASP300 – HIS499	200	~ 21200	-4
B / 1RH1	GLU315 – ILE510	196	21103	-4
N / 1A87	GLU189 – ARG387	199	21502	+7

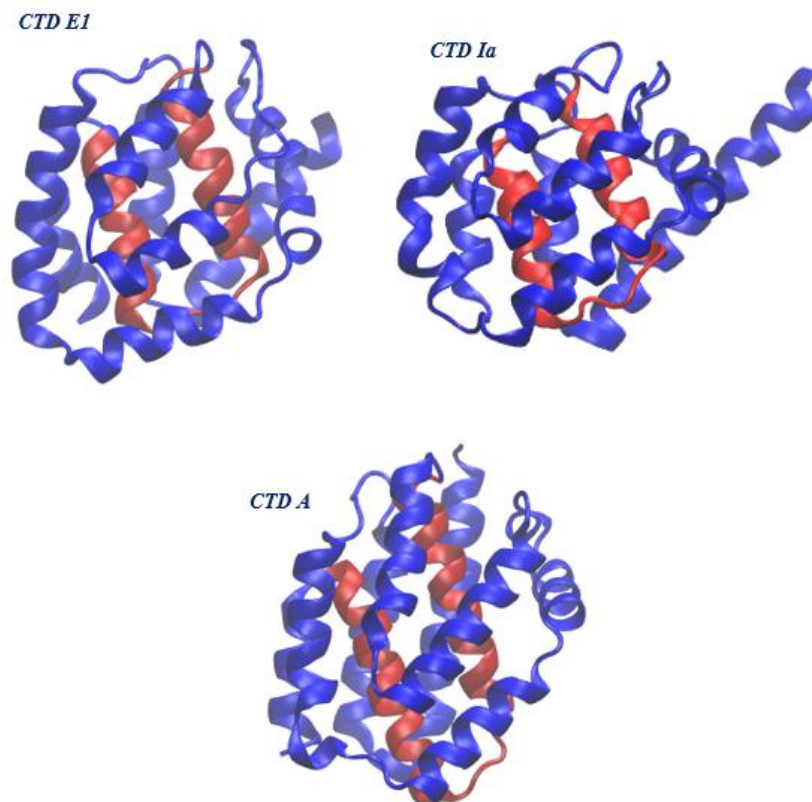
**Tab. 2:** Shrnutí praktických informací o kolicinových CTD skupiny (A). V tabulce je uvedeno vždy první a počáteční označení aminokyselinového zbytku CTD, celkový počet AMK CTD, celková váha a celkový náboj dané struktury.

### 2.3.2 CTD skupiny (E1) a (Ia)

CTD kolicinu E1 a Ia jsou zobrazeny na Obr. 4 společně s CTD kolicinu A, která je zde uvedena pro porovnání. Jejich pórotvorné vlastnosti jsou opět shrnuty v kapitole 2.5.1. Na základě struktury CTD kolicinu E1 byl navržen model pro její inserci do lipidové membrány včetně prvotních kroků jako je její navázání a rozptýlení po povrchu membrány (Zakharov et al. 1999, Lugo et al. 2016). Struktura Ia taktéž patří mezi nejvíce studované CTD.

Trojrozměrná struktura **CTD kolicinu E1 (2I88)** byla poprvé zveřejněna roku 2006 Elkinsem et al. Tato struktura obsahuje 178 residuí, 1392 atomů, 2852 vazeb, 251 donorů a 261 akceptorů H, celkem 326 H-vazeb. Publikovaný helix H1 je velmi krátký. Sekvence, jež by mu měla odpovídat podle MSA (Obr. 3), není do této struktury zahrnuta. První residuum helixu H1 zde začíná ILE345.

Model trojrozměrné struktury **CTD kolicinu Ia (1RH1)** byl poprvé publikován roku 1998 Wienerem et al. Jedná se o kompletní strukturu. Obsahuje 183 residuí a 1411 atomů. Praktické shrnutí dalších informací o těchto CTD je uvedeno v Tab. 3. Informace strukturách byly opět získány Gromacsovým nástrojem *pdb2gmx*.



**Obr. 4:** CTD skupiny (E1) a (Ia) jsou také tvořeny 10  $\alpha$ -helixy. Dva hydrofobní helixy H8 a H9 (červeně) jsou vždy obklopeny osmi amfifilními helixy H1 – H7 a H10 (modře). V porovnání s CTD kolicinu A tyto domény obsahují kratší AMK sekvenci odpovídající H8-H9. Struktury pocházejí z PDB (2I88, 1CII) a k jejich zobrazení byl použit program VMD.

CTD skupiny (E1) a (Ia)				
CTD / PDB ID	Residua CTD	<i>n</i> AMK v CTD	Celková váha[a. m. u]	Celkový náboj CTD [e]
<b>E1 / 2I88</b>	ILE345 – ILE522	178	19703	+3
<b>Ia / 1CII</b>	LYS442 – TRP624	183	20006	+7

**Tab. 3:** Shrnutí praktických informací o kolicinových CTD skupiny (E1) a (A). V tabulce je uvedeno vždy první a počáteční označení aminokyselinového zbytku CTD, celkový počet AMK CTD, celková váha a celkový náboj dané struktury.

### 2.3.3 Kolicinu U a jeho CTD

Kolicin U je produkován patogenní enterobakterií *Shigela boydii* a je schopný interakce s bakteriálními rody *Shigella* i *Escherichia* (Šmajš et al., 1997). Také je pórtvorný (Dolejšová, 2015, diplomová práce) a je nejvíce příbuzný s kolicinem A a B (Šmajš et al., 1997). Jeho CTD je sekvenčně podobná CTD B ze 73 % a ze 66 % s CTD kolicinu A (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Na základě sekvence jeho CTD ji lze zařadit do skupiny (A). Dá se tedy i očekávat obdobná struktura jeho CTD v solubilním stavu jakou mají zástupci této skupiny, a to především kolicin A a B. Teoretický model této očekávané trojrozměrné struktury jsou schopny zajistit různé bioinformatické algoritmy. Počet takovýchto algoritmů, nových zdrojových kódů, a celých programových balíků se velmi rychle zvyšuje. Tím se teoretické modely stávají stále více přesné. Nutno ale poznamenat, že nemalou zásluhu na tom mají různé bioinformatické soutěže.

V této práci byly studovány celkem tři modely CTD kolicinu U. Dva strukturní modely byly vygenerovány pomocí RosettaMembrane (<https://www.rosettacommons.org>) a představovaly již strukturu adaptovanou na lipidovou membránu. Třetí model pro CTD v solubilním stavu byl vygenerován skrze iTasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Jejich struktury jsou uvedeny ve 4. kapitole této práce.

## 2.4 Struktura CTD v lipidové membráně

Je možné, aby struktura monomerní a ve vodě rozpustné CTD odpovídala i struktuře, kterou zaujímá v membráně? Z hlediska trojrozměrné struktury pravděpodobně není (už jen kvůli hydrofobní vlásence), z hlediska sekundárních struktur jednotlivých helixů už je pravděpodobnost větší (Pattus et al., 1990). Při tom je ale také nutné vzít ještě v úvahu, že celý kolicin se musí k vnitřní membráně (IM) gramnegativní bakterie nejdříve translokovat přes membránu vnější. Během tohoto transportu může docházet k jeho částečné nebo úplné denaturaci (Duche et al., 1994).

I přes publikované struktury CTD krystalizované v roztoku, je jejich membránová struktura stále neznámá a zůstává předmětem velkého zájmu. Existuje spousta experimentálních prací snažících se nějak osvětlit její uspořádání a tajemné chování v membráně, nicméně se tato experimentální data někdy vylučují, anebo se liší pro různé pórtvorné koliciny. Již bylo navrženo vícero modelů membránové struktury CTD – a to v uzavřeném i otevřeném stavu. Některé modely

byly zavrženy ihned po publikování vyřešené trojrozměrné struktury CTD kolicinu A. Ale v průběhu dalších let byly některé zneuznané modely opětovně zkoumány.

Podle sekvenční analýzy hydrofobního profilu CTD jsou s velkou pravděpodobností v membráně lokalizovány helixy H8 a H9 hydrofobní vlásenky. Nejprve se předpokládalo, že prochází transmembránově (Pattus et al., 1990). Poté bylo pomocí metod molekulové dynamiky zjištěno, že z hlediska volné energie mohou být tyto helixy lokalizovány i horizontálně pod polární částí membrány (Prieto a Lazaridis 2011).

Určení membránové lokalizace ostatních helixů z publikovaných CTD v solubilním stavu je složitější, už jen kvůli jejich amfipaticitě. Paradoxní navíc je, že hydrofobní část sekvence, ač je lokalizovaná v membráně, se na stavbě kanálu pravděpodobně nejspíše vůbec nepodílí a funguje jen jako membránová „kotva („anchor“) pro ostatní helixy (Pattus et al., 1990). Jenomže dodnes není jisté, které části sekvence by se měly tedy přímo podílet na tvorbě póru, a zda není přeci jen možná jejich oligomerace přímo v membráně.

Před tím, než bude pojednáno o jednotlivých modelech, jsem se však rozhodla z hlediska účelnosti zařadit ještě kapitolu o metodách, které jsou ke studiu kolicinů využívány.

## 2.5 Přehled využívaných metod ke studiu CTD

Na začátku vědeckého výzkumu kolicinů byly využívány hlavně metody empirické. Určitý potenciál pro výzkum kolicinů, jakožto membránových proteinů obecně, mají i teoretické metody, jako jsou např. simulace MD. Přehled metod (experimentálních i teoretických) již použitých pro studium kolicinů, je shrnut v Tab. 4.

### 2.5.1 Experimentální studium pórtvorných proteinů

Studium kolicinů v in vitro systémech lze provádět, jelikož purifikovaný a rozpuštěný kolicin se může vázat do umělých modelových lipidových membrán a vytvářet v nich napěťově ovládané kanály bez jakéhokoliv přičinění proteinů cílových buněk (Schein, et al., 1978).

Mezi hlavní metody jejich studia patřilo vodivostní měření na liposomech, nebo dnes častěji spíše na arteficiálních planárních membránách. To není nikterak překvapivé vzhledem k tomu, že nejpočetnější skupinou kolicinů, jsou ty, které degradují elektrochemický gradient na membráně (Pattus et al., 1990). Planární lipidové membrány jsou ke studiu iontových kanálů výhodné, jelikož umožňují detekovat otevření a zavření pouze jednoho kanálu jako jedné události, a určit tak jeho

vodivost, dobu života, iontovou selektivitu, atd. Tyto tzv. „černé lipidické membrány (BLM) se tak nazývají proto, že při pohledu mikroskopem se vlivem odražejícího a interferujícího světla projevují černou barvou (Tien H. T., 1966).

Další hojně využívanou metodou, obzvláště pro stanovení topologie membránových proteinů, je jejich označení fluorescenčními značkami. Excitace těchto fluoroforů a následná detekce vlastností emitovaného záření poskytuje informace o prostředí, ve kterém se daný fluorofor nachází - zda v membráně, nebo v roztoku.

Použitá experimentální metoda	Příklad využití
„Fotobleaching“	Merrill a Cramer 1990
Biotinylace	Slatin et al. 1994, Jakes et al. 1999, Slatin et al. 2004
Mapování epitopů	Jakes a Cramer 2012
Saturační mutagenese	Song et al. 1991
Proteázová aktivita	Cramer a Zhang 1992
Zhášení fluorescence	Palmer a Merrill 1994, Malenbaum et al. 1998
Cysteinová mutagenese	Lakey et al. 1991, Duche et al. 1994
FRET	Lakey et al. 1991, Steer a Merrill 1994
HPLC, CD a fluorescenční spektroskopie	Steer et al. 1999
CD a diferenční skenovací kalorimetrie	Schendel a Cramer 1994
Časově rozlišené spinové značení	Shin et al. 1993
Akrylamidové zhášení	Merril et al. 1993, Tory a Merril 1999
MD simulace	Prieto a Lazaridis 2011
Cryo-EM	Greig et al. 2009
BLM	Slatin et al. 2004, Sobko et al. 2006
NMR	Kim et al. 1998

**Tab. 4.:** Přehled metod využívaných v současnosti pro studium struktury a funkce pórtvorných kolicinů. Tato tabulka vychází z informací obsažených v článku Lugo et al. 2016 a dále byla doplněna.



### 2.5.1.1 *Elektrofyzilogické vlastnosti publikovaných CTD PK*

Afinita CTD A (stejně tak E1) kolicinu k fosfolipidové membráně je vyšší v kyselém pH (Pattus et al. 1990). Rozpuštěný protein má při pH nižším než 4,5 vysokou schopnost vazby k záporně nabitě membráně. V literatuře se uvádí, že v těchto podmínkách v případě kolicinu A dochází ke ztrátě terciární struktury CTD při současném zachování struktury sekundární. Je tvořena tzv. „rozvolněná globule“ CTD (van der Goot et al. 1991), intermediální stav. Z energetického hlediska by pak kontakt hydrofobní vlásenky H8-H9 s lipidovou membránou mohl proběhnout snáze. Jenomže výskyt tohoto přechodového stavu nebyl zatím prokázán ani u kolicinu N (Evans et al. 1996), ani kolicinu E1 (Schendel a Cramer 1994).

Afinita CTD kolicinu A k membráně se také zvyšuje se zvyšující se hustotou negativního náboje na povrchu membrány. Na interakci CTD kolicinu A s fosfolipidy umělých membrán má tedy vliv: 1) typ polárních hlaviček a délka řetězců mastných kyselin (MK), 2) fyzikální stav membránových lipidů, 3) hodnota pH roztoku a iontová síla (Pattus et al. 1990), 4) koncentrace přítomných  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v roztoku (Sobko et al. 2006).

Při neutrální pH je afinita těchto kolicinů k lipidům pouze slabá a je inhibována i nízkou koncentrací soli. V bazickém pH koliciny A téměř nepenetrují lipidovou membránu a nejsou schopny vazby k fosfolipidům na povrchu membrány. V kyselém prostředí jejich afinita k fosfolipidové membráně naopak ohromně narůstá. Experimentální studium pomocí CD spektrometrie např. ukázalo, že pH roztoku příliš neovlivňuje množství helixů ve struktuře CTD, nebo ho neovlivňuje alespoň do té doby, než dojde k inserci CTD do lipidové membrány (Pattus et al. 1990).

Pórtvorné koliciny zabíjejí cílové buňky kinetikou „jediného zásahu“ – tzn. jedna molekula kolicinu postačuje k usmrcení jedné bakteriální buňky. Jedna molekula kolicinu by tedy měla být dostatečná k vytvoření póru (Bullock a Kolen 1995 citováno podle Parker a Feil 2005).

Všechny kolicinové kanály A, S4, B, U, N, E1 a Ia jsou závislé na napětí - otevírají se při kladném a zavírají při záporném napětí (Cascales at al. 2007). Všechny tvoří v planárních lipidových membránách dobře definované kanály s malou konduktancí. Její hodnota se při měření v 1M NaCl v pH 7 obvykle pohybuje v rozpětí 15-20 pS. A i když je tato hodnota poměrně nízká, tak to nutně nemusí znamenat, že by byl lumen kanálů úzký (Pattus et al. 1990). Kolicinové kanály vykazují více vodivostních stavů s vodivostí mezi 10 až 60 pS. Projevují jistou dynamiku chování.

Je tedy možné, že existuje více než jeden typ stavby póru v otevřeném stavu (Bullock a Kolen 1995 citováno podle Parker a Feil 2005).

Typická je pro ně nízká iontová selektivita, resp. špatné rozlišování mezi anionty a kationty. Projít jimi skrze membránu jsou schopné i tak velké molekuly jako je sacharóza nebo  $\text{NAD}^+$ , tzn. že průměr kanálového lumenu může být široký až 8-10 Å (Pattus et al., 1990).

Nelineární chování závislosti elektrické vodivosti jednoho kanálu na membránovém potenciálu, jakož i silná závislost jeho chování na pH, indikují, že lumen kanálu je pravděpodobně lemován nábojem aminokyselinových zbytků, které možná ionty elektrostaticky „zdržují“ v průchodu. Tyto AMK by mohly kontrolovat průchod iontů skrze kanál a mohly být tak být zodpovědné za malou vodivost jednotlivých kanálů (Pattus et al., 1990).

## 2.5.2 Teoretické studium PK

Vyřešené souřadnice jednotlivých atomů v publikovaných strukturách jsou obvykle získané rentgenovou krystalografií, NMR a cryo-EM. Nicméně experimentální vyřešení struktury je obtížné, i když je často naprosto zásadní pro pochopení funkce proteinů. Pokud se nedaří protein vykristalizovat, nebo je jeho studium zatíženo extrémními podmínkami nutnými pro experiment, lze jeho teoretickou strukturu alespoň vygenerovat pomocí některých programů.

Teoretické předpovědi proteinové struktury, tzv. predikce, jsou založeny na podkladě, že sekvence obsahují všechny informace o struktuře. „Ab initio“ modelování je stále pořád těžce uskutečnitelné zejména pro větší proteiny. Pro sekundární strukturu a menší fragmenty lze vyzkoušet např. iTasser (Wu et al. 2007, <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), nebo QUARK (Xu et al. 2012, <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>, dostupné k 8.8.2017). Modelování na základě podobnosti aminokyselinové sekvence, tzv. „homologní modelování“, je realizovatelné lépe. Jeho základním předpokladem je, že struktura proteinu s podobnou sekvencí bude mít i podobnou terciární strukturu (Biasini et al. 2014). Příkladem je např. SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>, dostupné k 8.8.2017).

Existuje mnoho různých softwarových balíčků, které se nějak pokouší pomocí matematických principů předpovídat, jak se bílkovina sbalí, jakou má geometrii, jakou strukturu má v membráně. Oblíbená je Rosetta (Rohl et al. 2004), která v rámci projektu Rosetta@home spojuje síly nevyužitých kapacit počítačů po celém světě.

V molekulovém modelování jde o nalezení stavu s nejnižší energií - prakticky jde o výpočet energií odpovídajícím různým konformačním stavům molekuly se změněnými pozicemi (souřadnicemi) atomů. Pokud je minimum nalezeno, generuje se finální struktura modelu. Existují dvě základní metody použité k výpočtu této energie. Jednou z nich je kvantová mechanika, která se snaží zachytit co nejdříve chování přírody a prakticky se očekává, že její výsledek bude blízký realitě. Druhou možností je pak mechanika molekulová, která sice metodicky skutečnému chování přírody odpovídat nemusí, ale její výsledek se mu musí blížit. Proto je nutné její výsledky vždy porovnat s experimenty.

## 2.6 Struktura CTD při interakci s membránou

Jak bylo uvedeno, první interakce CTD s lipidy vnitřní bakteriální membrány je intenzivně studována už mnoho let, a i když již bylo publikováno mnoho pokrokových článků objasňujících zásadní informace pro tyto interakce, stále není detailně vysvětleno, co se na povrchu membrány na atomární úrovni ve skutečnosti odehrává a jak dochází k samotné inkorporaci CTD do membrány. Modely CTD domény v membráně jsou neustále navrhovány, vyvráceny a aktualizovány. Přehled těch nejdůležitějších modelů je uveden v této kapitole.

### 2.6.1 Model uzavřeného kanálu – „umbrella“

První navržený a více uznávaný model inserce kolicinu do lipidové dvojvrstvy vznikl již v roce 1989 na základě analýzy různých vlastností povrchových postranních řetězců AMK zbytků CTD kolicinu A. Tento rozbor naznačil náhodné rozložení residuí z hlediska náboje, hydrofobicity a aromaticity s výjimkou povrchu smyčky mezi helixy H8 a H9. Tato smyčka je obklopena prstencem osmi pozitivně nabitými AMK residuí (residua LYS25, HIS29, LYS73, LYS76, HIS88, LYS97 a ARG201 CTD kolicinu A; 1COL) a obsahuje pouze jedno negativně nabitě residuum na povrchu, ASP78 (Parker et al. 1992, Lakey et al. 1994). Podle tohoto modelu k inserci CTD do membrány docházelo těmito třemi kroky:

- 1) K počáteční interakci s membránou příroda využila elektrostatických (dalekodosahových i krátkodosahových) interakcí – preferenci pozitivně nabitého prstence AMK zbytků k negativně nabitým fosfolipidům. Tento krok měl orientovat hydrofobní vlásenku kolmo (v pozdějších studiích toto bylo upraveno) k povrchu membrány (Pattus et al. 1990, Parker et al. 1992, Lakey et al. 1994).

- 2) Poté vlásenka spontánně penetrovala do membrány a zakotvila se v membráně, což iniciovalo konformační změnu v celém proteinu, který se začal otevírat jako deštník (Obr. 5, B), tak aby se dvě další nabitě vnější roviny s 8 amfipatickými  $\alpha$ -helixy se zachovanou sekundární strukturou rozprostřely po povrchu lipidové membrány (Pattus et al. 1990, Parker et al. 1992, Lakey et al. 1994).
- 3) Předpokládalo se, že energetická cena za rozbalení proteinové terciární struktury by mohla být vyvážena hydrofobním efektem v rámci inkorporace H8-H9 do hydrofobní části membrány. Tato konformace by pak mohla representovat uzavřený stav kanálu. Tedy stav, který je výchozí pro otevření kanálu (Pattus et al. 1990, Parker et al. 1992, Lakey et al. 1994).

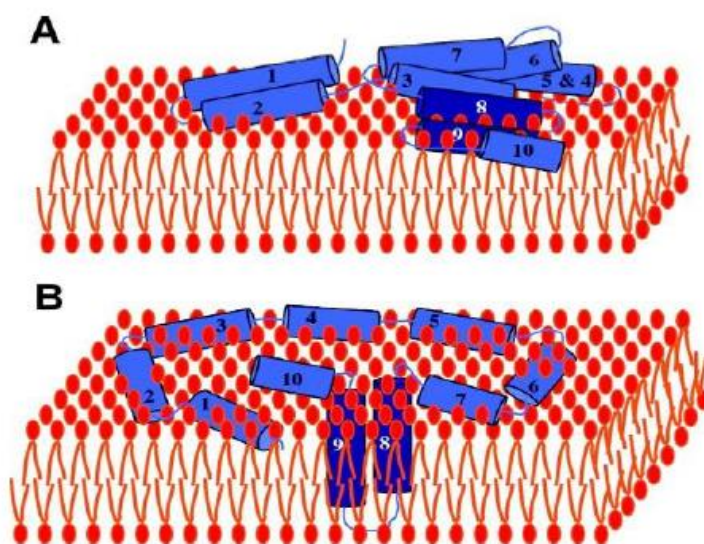
Následující krok pak předpokládal, že vložení negativního napětí na trans stranu membrány dojde k inserci dalších amfipatických helixů do membrány (Pattus et al. 1990, Parker et al. 1992, Lakey et al. 1994). Dříve se také předpokládalo, že tato inserce je pravděpodobně následovaná oligomerizací molekul CTD (Pattus et al. 1990), což se dnes obecně již neuvažuje (Cascales et al. 2007).

Tento model byl podpořen FRET měřením pro kolicin A (Lakey et al. 1991), nicméně následně provedené experimentální práce ho začaly vylučovat. To vedlo k vytvoření nového „penkníže modelu“, který hydrofobní vlásenku H8-H9 lokalizoval do těsné blízkosti ostatních helixů ležících na povrchu membrány (Lakey et al. 1993).

## 2.6.2 Model uzavřeného kanálu – „penkníže“

Model „penkníže“ (Obr. 5, A) byl podpořen experimentálním studiem využívajícím uměle zavedené disulfidické vazby mezi dvěma nepřírozenými cysteinovými residui sousedních  $\alpha$ -helixů struktury. Duche et al. (1994) pak pozoroval, že zabránění odklonění vlásenky H1-H2 od vlásenky H8-H9 inhibuje inserce kolicinu A do membrány. Další experimenty s časově rozlišenou FRET metodou pro kolicin E1 ukázaly, že počáteční rozprostření na membránovém povrchu začíná přeuspořádáním segmentu H9-H10. Teprve pak navazuje vzdalování segmentu H1-H2 od hydrofobní vlásenky H8-H9 následované vzdalováním dalších helixů H3-H7. Všechny amfipatické helixy jsou tedy opět rozprostřeny po povrchu lipidové membrány, ale jejich struktura je delší než v krystalové struktuře solubilního stavu (Zakharov et al. 1998, Zakharov et al. 1999, Lindenberg et al. 2000, Zakharov et al. 2002).

Data z měření na lipidových planárních membránách ale zase ukázala, že hydrofobní smyčka mezi helixy H8 a H9 je lokalizována na trans straně membrány v otevřeném i uzavřeném stavu póru (Kienker et al., 1997). To podporovalo deštníkový model, kdy H8-H9 zaujímá vertikální orientaci v lipidové membráně i bez vložení vnějšího napětí na membránu (Slatin et al. 2004). Tyto výsledky se lišily v závislosti na druhu kolicinu (A, E1, Ia). Další možnou komplikací je poznatek, že kolicin A interaguje s membránou ve formě „denaturované globule“. V ní je na rozdíl od terciární struktury sekundární struktura zachována (van der Goot et al. 1991). V případě kolicinu N a E1 se ale zdá, že tomu tak není (Evans et al. 1996, Zakharov a Cramer 2002). Je tedy možné, že navzdory podobným terciárním strukturám CTD v solubilním stavu, se chování těchto kolicinů liší a jejich membránové modely se musí uvažovat zvlášť (Cascales et al. 2007).



**Obr. 5:** A) „Penknife“ model struktury „kanálu“ CTD kolicinu v uzavřeném stavu. B) Model „umbrella“ struktury CTD kolicinu v uzavřeném stavu póru. Obrázek byl převzat z Cascales et al. 2007.

### 2.6.3 Model uzavřeného kanálu kolicinu E1 pro rok 2017

Důkazy shromážděné k roku 2016 naznačovaly, že před vložení do lipidové membrány dochází ke strukturálnímu přeuspořádání CTD kolicinu E1. Nejprve se tato CTD navázala na lipidovou dvojvrstvu, pak byly jednotlivé helixy CTD rozvolněny po jejím povrchu (Zakharov et al. 1998). Hydrofobní helixy H8-H9 byly inkorporovány transmembránově a v membráně

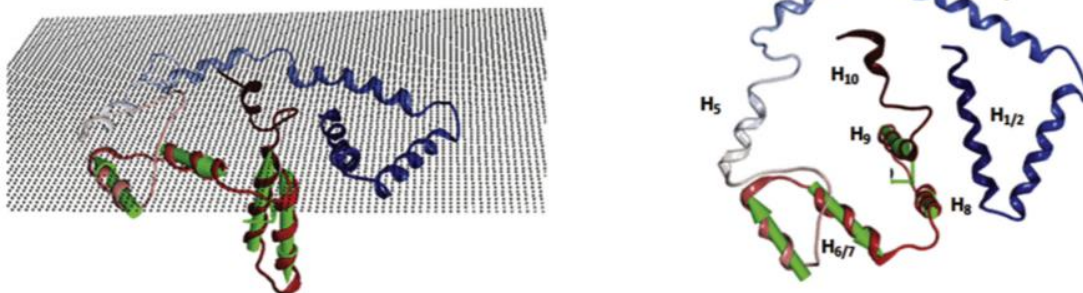
zaujímaly umístění modelu umbrella. Pro tvorbu napětově ovládaného kanálu jsou rozhodující. Díky nim je kanál vytvořený ostatními helixy stabilně „držen“ uvnitř lipidové membrány (Song a Cramer 1991, Zakharov a Cramer 2002). Ostatních osm amfipatických helixů struktury CTD v uzavřeném stavu póru (H1-H7 a H10) bylo rozloženo na povrchu membrány, kde postupně docházelo k jejich „prodlužování“. K formaci a otevření kanálu v membráně tímto kolicinem docházelo po vložení trans-negativního membránového potenciálu. Deštníkový model je silně podpořen experimenty z časově rozlišených FRET měření pro kolicin A (Steer a Merrill 1994). Detailní popis kontaktu lipidů s helixy je však touto metodou těžko pochopitelný.

V roce 2000 bylo proto FRET měření rozšířeno na všechny  $\alpha$ -helixy k residuu CYS509 (Lindenberg et al. 2000). Tato naměřená data podporují kruhově uspořádání těchto osmi helixů ležících na povrchu membrány. V roce 2013 Ho et al. však na základě další sady FRET měření navrhl nový model. Ten obsahoval kruhově uspořádané helixy H1 – H7, ve směru hodinových ručiček z extracelulární strany membrány, kolem hydrofobní vlásenky uprostřed (Ho et al. 2013).

Dále bylo prokázáno, že helix H1 a H2 se účastní tvorby póru vytvořením transmembránového segmentu při vložení externího napětí na membránu (Tory a Merrill 1999). Proto bylo třeba aktualizovat navržený model s důrazem na pozici a orientaci H1-H2 segmentu.

Toho se roku 2016 chopil Lugo et al. a byla provedena další sada FRET měření. Ty byly založeny na experimentálním změření vzdálenosti mezi třemi přirozeně se vyskytujícími TRP residui a třemi zvolenými místy v helixu H1. Tyto 3 AMK zbytky v sekvenci byly nahrazeny buď CYS nebo PHE a označeny Bim. Přirozeně se vyskytující residuum CYS505 bylo nahrazeno u všech variant ALA505. Lugo et al. (2016) potom navrhl aktualizovaný deštníkový trojrozměrný model E1 kolicinového kanálu s nízkým rozlišením (obr. č.). Ten obsahoval vhodnou lokaci pro vlásenku H1-H2, která se posléze mohla uplatnit jako funkční segment otevřeného póru. H8-H9 v něm zaujímá standardní transmembránovou lokalizaci a působí jako hydrofobní kotva. Ostatní helixy jsou kolem ní kruhově uspořádány po periferii membrány (Lindenberg et al. 2000, Ho et al. 2011).

Odlišnost jeho modelu od modelu Ho et al. 2013 je v tom, že helixy H1-H7 jsou kolem H8-H9 z extracelulární pohledu v orientaci proti směru hodinových ručiček (dříve po směru). Geometrie amfipatických helixů, jakož i vertikální pozice vlásenky H6/H7 a H8-H9, je zachována. Nově je ale uvažována forma vlásenky H1-H2 solubilního stavu.



**Obr. 6:** Trojrozměrný model CTD kolicinu E1 v uzavřeném stavu póru navržený Lugem et al. roku 2016. Helixy H1 – H7 a H10 v tomto modelu leží na povrchu membrány (proti směru hodinových ručiček). Helixy H8 – H9 jsou lokalizovány kolmo k povrchu membrány. První část obrázku (vlevo) zobrazuje šedou barvou rovinu cis strany membrány. Druhá (vpravo) pak zobrazuje pohled shora na tuto membránu. N-konec je označen modře, C-konec červeně. Zeleně jsou označeny vektory referenčních os H6-H9. Obrázek byl převzat z publikace Lugo et al., 2016.

## 2.6.4 Model otevřeného kanálu skupiny (A), (Ia) a (E1)

Doposud neexistuje žádný vědecky přijatý model membránové struktury CTD kolicinu v otevřeném stavu póru. Bylo navrženo již několik modelů, nicméně kolem nich panuje velká nejistota. Otázka monomerní stavby kolicinových póru také nebyla uspokojivě zodpovězena. Jejich vnitřní průřez je totiž patrně moc velký na to, aby byl tento pór tvořen pouze monomerním. Také není jasné, zda si helixy CTD těchto kolicinů zachovávají svou helikální strukturu i v lipidové membráně. Dále se stále jednoznačně neví, které helixy CTD jsou pro stavbu póru nutné, i když publikovaných prací zabývajících se tímto tématem je mnoho. V následujících odstavcích je proto uveden vývoj vědeckého snažení o určení membránové topologie CTD v otevřeném stavu póru pro skupinu CTD (A), (E1) a (Ia).

### 2.6.4.1 Role jednotlivých helixů CTD kolicinů na stavbě póru

K určení důležitosti jednotlivých helixů CTD kolicinů na stavbě póru byly již prováděny pokusy např. s delečními mutanty kolicinu A (Baty et al. 1990), E1 (Liu et al. 1986). Bylo např. zjištěno, že pokud je z N-konce odstraněn helix H1, H2, H3 CTD A, tak není zabráněno tvorbě póru. Jeho kvalitativní vlastnosti byly zachovány (Baty 1987, Nardi 2001). V případě fragmentu

CTD kolicinu A byl pór vytvořen pouze 136 AMK (Baty et al., 1990). Provedené delece částí CTD kolicinu A také naznačují, že důležité pro stavbu kanálu v otevřeném stavu jsou pravděpodobně helixy H5 – H9 (Baty et al. 1987). V případě kolicinu E1 stačilo z celé CTD zachovat pouze helixy H5 až H10. Tento fragment tvořený pouze 88 AMK residui vytvářel kanál s vlastnostmi, které se kvalitativně příliš neodlišovaly od celé CTD (Liu et al. 1986). S přihlédnutím k dalším experimentálním výsledkům se zdá, že kolicinový kanál je tvořen jen šesti helixy (Lakey a Slatin, 2001), ev. v případě kolicinu Ia pouze čtyřmi helixy (Slatin et al. 2002).

#### **2.6.4.2 Translokace helixů CTD kolicinu Ia při otevření póru**

Pomocí metody biotinového značení bylo např. pro kolicin Ia zjištěno, že helixy H2-H5 (tzn. LEU474-TYR541) jsou po vložení kladného napětí na membránu a otevření kolicinového kanálu schopny přejít na trans stranu membrány (Kienker et al. 1997). Jednak je to opět vylučuje jako potenciálně transmembránově procházející, a jednak je z toho patrné, jak pozoruhodné chování těchto proteinů je. Jsou schopny přes vnitřní membránu translokovat do cytosolu svou cca 35% část (Slatin et al. 1994, Qio et al. 1996). Jako transmembránové helixy poté pravděpodobně zůstanou jen čtyři: H1 (ILE454-LEU474) a H6/7 (residua TYR541 – GLY577) a část hydrofobní vlásenky (Kienker et al. 1997, Greig et al. 2009). Nicméně helixy CTD v solubilním stavu jsou příliš krátké (obsahují obvykle cca 12-13 AMK zbytků). Na příčný průchod plazmatickou membránou je potřeba alespoň 20 AMK residuí (Greig et al. 2009). Proto bylo navrženo, že dochází před tvorbou kanálu (nebo při ní) k prodlužování helixů (Lugo et al., 2016).

Translokace určitých helixů pravděpodobně částečně vysvětluje odlišné experimentální chování izolované CTD kolicinu Ia a CTD, která je součástí celého kolicinu Ia. V případě izolované CTD bylo zjištěno, že její H1 je volně translokován spolu s H2 až H5 na trans stranu membrány na rozdíl od situace, kdy je ke studiu použit celý kolicin Ia (Jakes et al. 1999). Tzn. že kanál tvořený izolovanou CTD by měl poté pravděpodobně pouze tři transmembránové segmenty.

Tato úvaha vychází z experimentálního poznatku, že kanály této izolované CTD jsou při napětí 50 mV ve dvou konformačních formách. A to z toho důvodu, že při měření jejich vodivosti na planárních membránách se nejprve otevřely na vodivost 50 pS v 1M KCl, a pak přešly na vodivost šestkrát menší - konkrétně 7 pS v 1M KCl. Malá vodivost je zřejmě způsobena přechodem H1 na trans stranu membrány. Jedná se pravděpodobně o výsledek fyzicky menšího lumen kanálu (Kienker et al. 2000).



Pro vnitřní lumen kanálu Ia kolicinu bylo zjištěno, že jeho průměr při vstupu z cis strany byl 1,8 nm a průměr při průchodu z trans strany byl 1,0 nm. Kanál obsahoval zároveň zúžení o velikosti 7 Å v těsné blízkosti trans vstupu (Krasilnikov et al. 1998). Další studie používající cysteinové mutagenese ale naopak naznačily, že kanál má spíše tvar přesýpacích hodin s nejvíce zúženou částí umístěnou asymetricky poblíž cis strany.

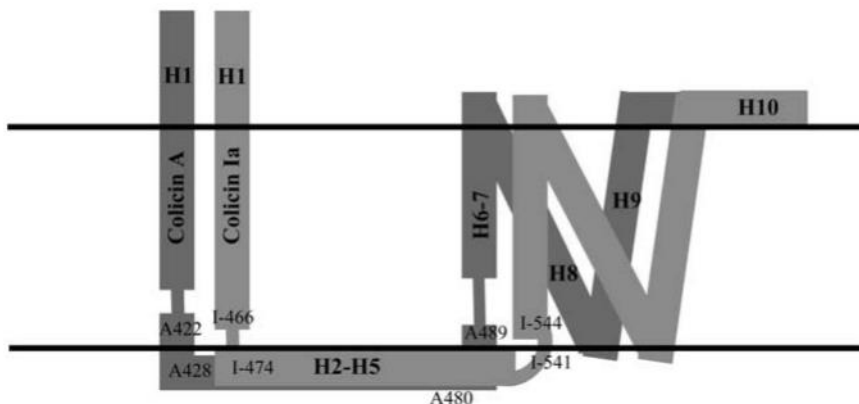
Dále bylo zjištěno, že uzavření tří-helikálního kanálu je mnohem pomalejší. Konkrétně kanál o „normální velikosti“ se okamžitě uzavřel po vložení 50 mV ( $I_{a1}$ ), kdežto kanál menší ( $I_{a2}$ ) zůstal otevřený déle než dvě minuty (Slatin et al. 2004). Pravděpodobně z důvodu potřebné práce, kterou je třeba vykonat pro přemístění H1 zpět do lipidové membrány.

#### **2.6.4.3 Translokace helixů CTD kolicinu A při otevření póru**

Izolována CTD kolicinu A také prochází vodivostním přechodem. Kromě toho obsahuje segment, který je translokován na trans stranu membrány, jak zjistili Slatin et al. (2004). V jejich práci nahradili daná residua CTD kolicinu A unikátními cysteiny v dané pozici a tyto mutované proteiny biotinylovali. K detekci pozice biotinylovaných residuí vůči lipidové membráně použili streptavidin. Dále provedli sadu měření na BLM (použili azolektin). Linker, který připevňoval biotin k cysteinu byl dlouhý 15 Å. Jeho minimální krystalografická vzdálenost je 7 Å (Freitag et al. 1997), dalších jeho 8 Å odpovídá délce vazby streptavidu na biotin. Z toho vyplývá, že disulfidická vazba může být stále lokalizována v lipidové membráně 15 Å od trans strany a navázaný biotin bude mít stále přístup k vodné fázi (Slatin et al. (2004). Model, který na základě jejich analýzy navrhli, je uveden na Obr. 7.

#### **2.6.4.4 Translokace molekul CTD kolicinu**

Translokační dráha přechodu těchto helixů na trans stranu membrány však může být přítomna pouze přechodně. Bylo totiž zjištěno, že koliciny jsou schopny translokovat i proteiny s nimi fúzané (Jakes et al. 1998, Slatin et al. 2002). Nebo, že skrz pór je schopná se translokovat i molekula o velikosti 2,6 nm, což je neslučitelné s nízkou vodivostí otevřeného kanálu kolicinu (Kienker et al. 2003).



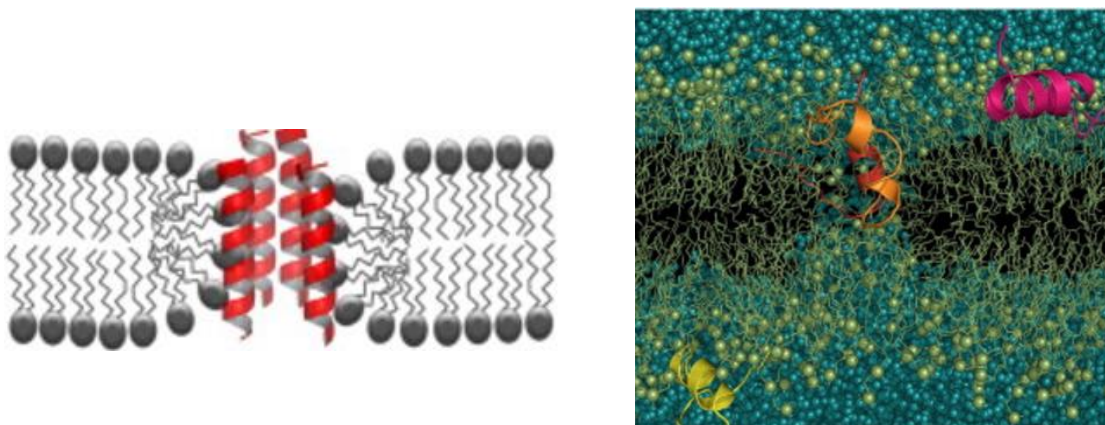
**Obr. 7:** Model navržený pro CTD kolicinu A a Ia v otevřeném stavu na základě metody biotinylace. Válečky představují jednotlivé helixy krystalografické CTD. Smyčka mezi H1/H2 a H5/H6 je zobrazena užší čarou. Úzká černá čára představuje hranici lipidové membrány. Zakreslena jsou i „sledovaná“ rezidua. Obrázek byl převzat z publikace Slatin et al. (2004).

### 2.6.5 Toroidní model pro otevřený kanál skupiny (E1)

Je známo, že koliciny tvoří slabě selektivní póry o přibližné velikosti cca 1 nm. Tato velikost porů příliš neodpovídá předpokladu, že by se na stavbě poru měly účastnit pouze čtyři nebo šest helixů. Tento problém by však mohl být vyřešen v případě zohlednění účasti membránových lipidů v tvorbě kanálu (Cascales et al. 2007).

Sobko et al. roku 2004 publikoval model struktury CTD kolicinu E1 v lipidové membráně ve stavu otevřeného poru. Předpokládal, že kolicinové kanály jsou tvořeny pouze několika  $\alpha$ -helixy a zároveň uvažoval, že dle experimentálních dat těmito kanály mohou procházet relativně velké molekuly. V jeho modelu je tedy kolicinový kanál tvořen zároveň membránovými lipidy. V něm polární hlavičky lipidové membrány vyplňují prostor mezi jednotlivými helixy. U jiných kolicinů tento model zatím nebyl potvrzen.

Pro tento kolicin bylo publikováno již několik prací, které ho potvrzují. Např. při zkoumání účinku  $\text{Ca}^{2+}$  iontů bylo zjištěno, že tyto ionty potlačují aktivitu kolicinového kanálu E1 pro membránu diphytanoylphosphatidylglycerol. Tento účinek ale nebyl pozorován na diphytanoylphosphatidylcholinu. Ionty  $\text{Ca}^{2+}$  snižovaly počet otevřených kanálů (ne jejich vlastností). V souladu s tímto modelem autoři účinek  $\text{Ca}^{2+}$  iontů vysvětlili změnou v zakřivení membránových lipidů způsobeným elektrostatickou interakcí  $\text{Ca}^{2+}$  ionty s negativně nabitými lipidovými hlavičkami (Sobko et al. 2006).



**Obr. 8:** Model toroidní stavby póru. V levé části je schématické znázornění toroidního zakřivení membrány způsobené vloženými helixy. V pravé části je potom záznam ze simulace. Obrázek byl převzat z publikace Sengupta et al. (2008).

### 2.6.6 Oligomerizace monomerů CTD

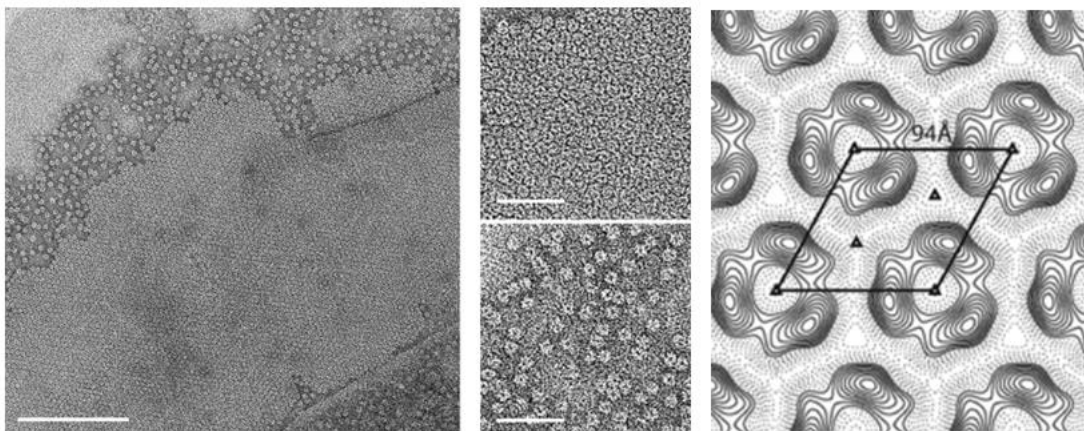
Úplně první více uznávaný model CTD kolicinu A v membráně oligomerizaci předpokládal. Nicméně následná elektrofyziologická měření na planárních lipidových membránách oligomerizaci vyvracela. Data jednoznačně ukazovala lineární nárůst počtu otevřených kanálů (vyšší průchod proudem membránou) se zvyšující se koncentrací molekul v roztoku. Tvorba kolicinových monomerních kanálů je podporována např. publikacemi Peterson a Cramer 1987, Tory a Merrill 1999). A byla několikrát přezkoumána různými laboratořemi. Přesto se však opakovaně objevují nové články, které jistou oligomerizaci helixů CTD nevyklučují, ba naopak ji dokonce spíše podporují. Např. pro kolicin Ia je to Greig et al. 2009, pro kolicin E1 Steer et al. 1999, a pro kolicin A Dunkel et al. 2015. Výsledky těchto prací jsou krátce představeny.

#### 2.6.6.1 Kolicin Ia

Velký průměr kanálu Ia vytvořeného pouze čtyřmi transmembránovými segmenty by mohl naznačovat, že jej budou tvořit oligomery molekul kolciinu Ia. Nicméně všechny dosavadní studie zaměřené na studium oligomerního stavu jakéhokoliv kolicinového kanálu naznačily monomerní struktury. Roku 2009 byl však navržen model oligomerní struktury kanálu vytvořeného kolicinem Ia (Greig et al. 2009). Autoři nechali zabudovat do lipidové dvojvrstvy POPG:POPC v poměru 1:1 v pH 4.5 CTD kolicinu Ia a provedli jejich zesíťování. Měřili sedimentační rychlosti částic a

analýzu provedli mj. i pomocí elektronových mikrofotografií (Obr. 9). Použili Cryo-EM. Určili, že po vložení do membrány CTD kolicinu Ia tvořily oligomery (Greig et al. 2009).

Jimi navržený model obsahuje multimery o 6 až 8 monomerech včetně přidružených lipidů (ev. detergentů). Kruhovitý oligomer měl průměr cca 8 nm. Autoři však také připouští, že i když jejich výsledky silně naznačují multimerní formu kanálu, tak k vytvoření funkčního kanálu oligomer možná není nutný (Greig et al. 2009).



**Obr. 9:** První obrázek (vlevo) zobrazuje elektronovou mikrofotografii inkorporovaného kolicinu Ia do lipidové dvojvrstvy ve formě oligomerů a 2D krystalů. Jednotlivé spakované částice CTD Ia jsou zobrazeny v další části obrázku. Poslední část obrázku (vpravo) představuje hustotní mapu oligomeru vypočítanou matematickými korekcemi metody. Je z něj zřejmá šestihránná symetrie struktury. Obrázek byl převzat z Greig et al. 2009.

### 2.6.6.2 *Kolicin E1*

Steer et al. v roce 1999 zjistili, že kolicin E1 může oligomerizovat, pokud denaturuje. Stanovili, že k jeho denaturaci dochází v podmínkách 8,5 M močoviny. Z měření CD autoři potom určili, že dochází k dimerizaci. Jejich tvrzení ověřili pomocí HPLC, SDS/PAGE a měření FRET. Dále určili, že je tato denaturace ireverzibilní.

### 2.6.6.3 *Kolicin A*

V roce 2015 byla publikována práce (Dunkel et al. 2015), ve které autoři tvrdili, že kolicin A tvoří v lipidové membráně pravděpodobně dimery. Jejich pozorování bylo založené na metodě místně specifického spinového značení (SDSL) a elektronové paramagnetické resonance (EPR).

Jejich práce navazovala na práci Greig et al 2009. A autoři v ní vysvětlovali, proč jsou póry tvořené těmito proteiny tak velké (~1 nm). Ovšem roku 2017 bylo zjištěno, že dimerizace kolicinu CTD kolicinu A je vyvolaná teplem (Huang et al. 2017). Nicméně autoři práce Dunkel et al. 2015 uváděli, že k zisku EPR spekter použili pokojovou teplotu. A jejich pozorování odráží tendenci kolicinu A tvořit dimery za fyziologických podmínek.

Ovšem se zohledněním této jejich hypotézy, jak potom vysvětlit elektrofyziologická měření na planárních lipidových membránách podporující monomerní strukturu kanálu? Je snad možné, aby se koliciny projevovaly ve formě monomerní i oligomerní? Záleží snad jen na typu použité metody, která jejich forma se projeví více?

Odpověď na tuto otázku, kterou jsem si položila, zatím není v současné literatuře zodpovězena. Jelikož bych na ni tedy ráda znala odpověď, rozhodla jsem se jí podrobněji zabývat ve své další navazující práci. První krůčky k jejímu vyřešení jsou však uvedeny již ve výsledkové části této závěrečné práce.

### 3 Cíle práce

- Hlavním cílem této práce je prostudovat chování jednotlivých helixů C-terminální domény (CTD) kolicinu U v lipidové membráně. Metoda, která je k tomuto účelu zvolena, je molekulová dynamika (MD). Tato metoda je také schopná informovat o vývoji struktury jednotlivých helixů v membráně v čase. Z jejích výsledků by také měly vyplynout odpovědi na otázky týkající se lokalizace a orientace helixů.
- Dílčím cílem této práce je také empirické ověření chování helixu H1 kolicinu U pozorovaného v MD simulacích pomocí jeho chemické syntézy a následného experimentálního studia na černých lipidických membránách (BLM).
- Na základě chování H1 v MD simulacích, jsem si během práce zadala další cíl - porovnat chování H1 kolicinu U s chováním H1 ostatních pórtvorných kolicinů.
- Dále jsem se rozhodla prozkoumat pomocí MD i chování delšího segmentu CTD v lipidové membráně.

## 4 Materiál a metoda

### 4.1 Metoda MD simulací

Simulace molekulové dynamiky je jednou z metod počítačových simulací. Kromě této metody, kterou ve své práci využívám, existují ještě Monte Carlo simulace a různé hybridní techniky. MD simulace umožňuje pochopit dynamický vývoj systému - na atomární úrovni a v reálném čase. Poskytuje tak informace o interakcích molekul a jejich strukturálních změnách. Dokáže přinést zásadní poznatky, které není možné jinými metodami ověřit. Také ji lze využít pro studium dějů, které jsou experimentálně těžce proveditelné kvůli vysokým tlakům, teplotám, aj. (Allen 2004). V mikrobiologii by se např. MD simulace mohly nezastupitelně uplatnit při studiu různých peptidů extrémofilních archeobakterií. V současnosti se tato metoda stává naprostou samozřejmostí běžného vědeckého výzkumu. Používá se k vysvětlení experimentálních výsledků a k ověření z nich navržených modelů. Možný je i postup opačný, nicméně je poté třeba vždy najít odpovídající způsob, jak model experimentálně podložit. MD simulace tak tvoří spojnici mezi makroskopickým projevem hmoty, který je možné experimentálně změřit, a jeho mikroskopickou podstatou založenou na teorii. Prostřednictvím této podstaty lze daný jev pak snáze pochopit (Allen 2004).

Klasická MD simulace vychází z 2. Newtonova zákona. Pohyb atomů v daném systému v čase, tj. jejich trajektorie, může být získán vyřešením klasických Newtonových pohybových rovnic. Ty mohou být jednoduše zapsány jako:

$$m_i \ddot{r}_i = \vec{F}_i \quad (4.1)$$

$$\vec{F}_i = -\frac{\partial}{\partial r_i} V \quad (4.2)$$

Rovnice (4.1) je zápis 2. Newtonova zákona, zákona síly  $\vec{F}$ , ve kterém  $m_i$  představuje hmotnost částice  $i$  a  $\ddot{r}_i$  její zrychlení. Zrychlení je druhou derivací dráhy podle času (druhou derivaci fyzikové značí dvěma tečkami). Aby bylo možné vypočítat zrychlení dané částice, je třeba nejprve vypočítat sílu  $F_i$ , která na částici působí. Rovnice (4.2) představuje vztah, kterým lze tuto sílu  $F_i$  získat – je třeba vypočítat derivaci potenciální energie  $V$  každého atomu v daném systému definovaném souřadnicemi  $x$ ,  $y$  a  $z$  v kartézském souřadnicovém systému (Allen 2004). Rovnice (4.1) a (4.2) byly převzaty z Allen (2004) a upraveny.

### 4.1.1 Silové pole

Potenciálová funkce  $V(r)$ , tj. funkce používaná pro výpočet potenciální energie systému závisující na atomových souřadnicích, je složena z několika složek, které komplexně popisují všechny interakce mezi atomy v daném systému. Tímto systémem může být např. peptid v lipidové membráně. Tato funkce (4.3) se označuje pojmem silové pole (Force Field, FF) a zahrnuje v sobě interakce vazebné i nevazebné (MacKerell et al. 1998, Oostenbrink et al. 2004). FF pro vazebné interakce definuje hodnoty ideálních délek  $b$  konkrétních vazeb, vazebných úhlů  $\theta$  a torzí  $\gamma$ . Čím více se pak skutečná hodnota těchto parametrů liší od hodnoty FF, tím vyšší energii má určitá interakce. A čím nižší je energie, tím stabilnější je vazba a vyšší pravděpodobnost správné konformace molekuly. FF pro nevazebné interakce zahrnuje jak van der Waalsovy síly, tak coulombické dalekodosahové síly. To je definováno jako působení mezi bodovými náboji  $Q_i$  a  $Q_j$  každé dvojice atomů.

$$V(r) = V(r)_{\text{vazebné interakce}} + V(r)_{\text{nevazebné interakce}} \quad (4.3)$$

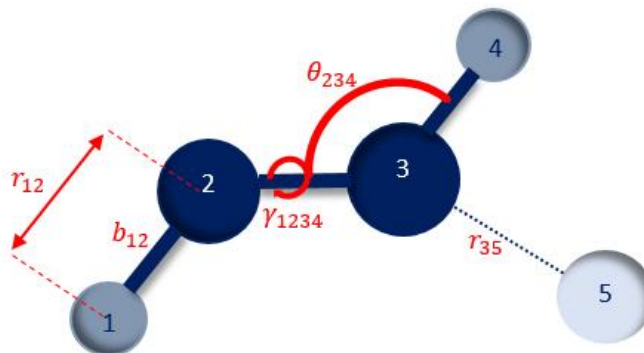
$$\begin{aligned} V(r)_{\text{vazebné interakce}} &= \frac{1}{2} \sum_{\text{vazby}} k_{ij}^r (b_{ij} - b_{eq})^2 \\ &+ \frac{1}{2} \sum_{\text{vazebné uhly}} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{eq})^2 \\ &+ \frac{1}{2} \sum_{\text{torzní uhly}} \sum_m k_{ijkl}^{\phi, m} [1 + \cos(m\gamma_{ijkl} - \delta_m)] \end{aligned} \quad (4.4)$$

$$V(r)_{\text{nevazebné interakce}} = \sum_{\text{vdW}} \left[ \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6} \right] + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_c \left[ \frac{Q_i Q_j}{r_{ij}} \right] \quad (4.5)$$

První sumační člen rovnice FF pro vazebné interakce obsahuje všechny vazby dané molekuly. Druhý sumační člen pak zahrnuje všechny její vazebné úhly definované třemi atomy. Jako poslední v rovnici (4.4) je potom uvedena sumace přes všechny torze definované čtyřmi body. Člen  $\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6}$  rovnice (4.5) představuje aproximaci pro van der Waalsovy interakce,  $\frac{Q_i Q_j}{r_{ij}}$  je člen coulombického působení. Rovnice (4.4) a (4.5) byly převzaty z Ponder et al. 2003 a Allen 2004 a upraveny.  $r$  a  $b$  značí délku vazby,  $\theta$  vazebný úhel a  $\gamma$  torzi.  $Q_i, Q_j$  představují bodové náboje.



Všechny složky této funkce  $V(r)$  jsou znázorněny na následujícím Obr. 10 a více přiblíženy níže.



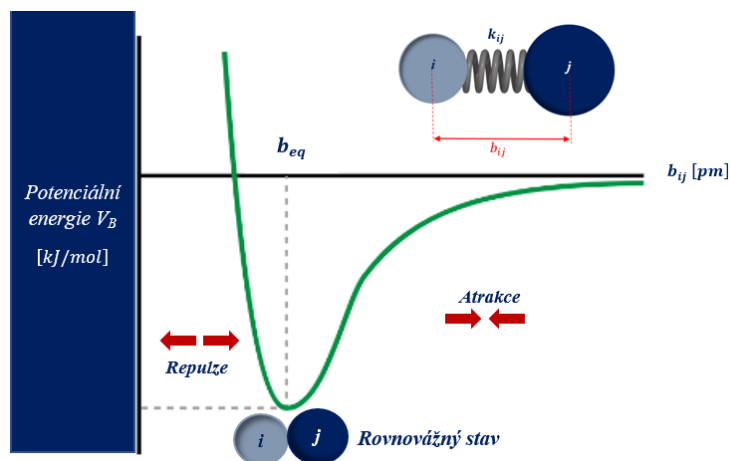
**Obr. 10:** Geometrie molekuly, ve které jsou její kovalentní vazby označeny tmavě modrou silnou čarou. Přerušovaná modrá čára označuje nevazebnou interakci elektrostatičkého charakteru. Atomy molekuly jsou zde pro zjednodušení označeny číslem. Označení  $b_{12}$  popisuje délku kovalentní vazby (pnutí) mezi atomem 1 a 2;  $\theta_{234}$  vazebný úhel svíraný atomy 2, 3 a 4;  $\gamma_{1234}$  je torze atomů 1, 2, 3, 4;  $r_{35}$  je délka nevazebné interakce mezi atomem 3 a 5. Tento obrázek byl nakreslen na základě ilustrací v článku Ponder et al. 2003 a Allen 2004.

#### 4.1.1.1 Pnutí vazeb

Potenciální energie kovalentní vazby dvou atomů, tzv. pnutí vazeb  $V_B$ , závisí na její délce. Tato skutečnost je zachycena na (Obr. 11) a lze ji modelovat několika interakčními potenciály – např. harmonickým nebo Morseho (Morse 1929). Rovnice (4.6) popisující potenciální energii harmonického potenciálu je nejjednodušším modelem pro pnutí vazeb a vychází z Hookova zákona.

$$V_B = \frac{1}{2} k_{ij}^r (b_{ij} - b_{eq})^2 \quad (4.6)$$

Atomy a jejich vazbu si lze představit jako kuličky spojené pružinkou (Obr. 11). Energie kovalentní vazby lze proto vyjádřit přes funkci výchylky od ideální (referenční) délky vazby  $b_{eq}$ , kde konstanta  $k_{ij}^r$  definuje sílu vazby (manuál Gromacsu 5.1.4). Pokud jsou dva atomy  $i$  a  $j$  od sebe ve vzdálenosti  $b_{ij} \geq b_{eq}$ , vzájemně se přitahují. K jejich odpuzování naopak dochází, jsou-li příliš blízko u sebe, tedy když  $b_{ij} < b_0$ . Rovnovážní stav, ve kterém jsou vyrovnány přitažlivé i odpudivé síly, udává hodnotou ideální délky vazby  $b_{eq}$ . Harmonický potenciál zohledňuje typ vazby a její násobnost.

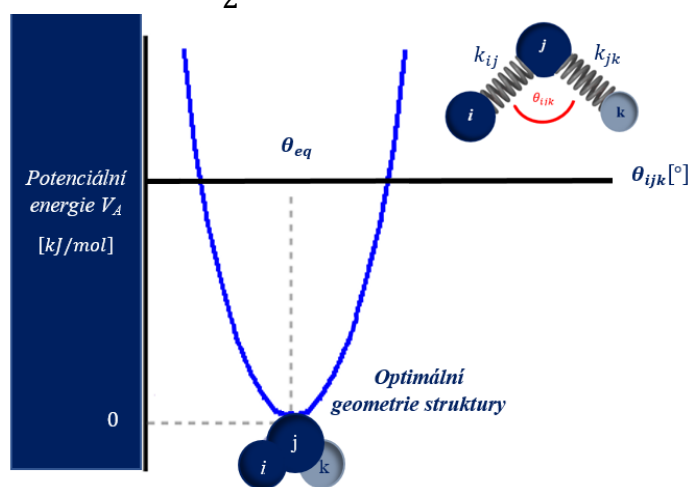


**Obr. 11:** Potenciální energie  $V_B$  kovalentní vazby dvou atomů  $i$  a  $j$  je funkcí její délky. Tvorba obrázku byla inspirována ilustrací v <https://ch301.cm.utexas.edu/> (k 5.8.2017). Obrázek byl dále doplněn podle informací v manuálu Gromacsu 5.1.4 a Atkins' Physical Chemistry 9. edice.

#### 4.1.1.2 Potenciál vazebných úhlů

Potenciální energie ohýbání vazebných úhlů je daná odchylkou od ideální geometrie optimalizované struktury, ve které by se měla blížit nule (Obr. 12). Opět lze tuto funkci modelovat např. harmonickým potenciálem. Její popis je v tomto případě dán rovnicí (4.7), kde  $\theta_{ijk}$  je vazebný úhel a  $\theta_{eq}$  ideální vazebný úhel. Konstanta  $k_{ijk}^\theta$  v tomto případě závisí na typu atomů, mezi kterými je vazebný úhel (manuál Gromacsu 5.1.4).

$$V_A = \frac{1}{2} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{eq})^2 \quad (4.7)$$



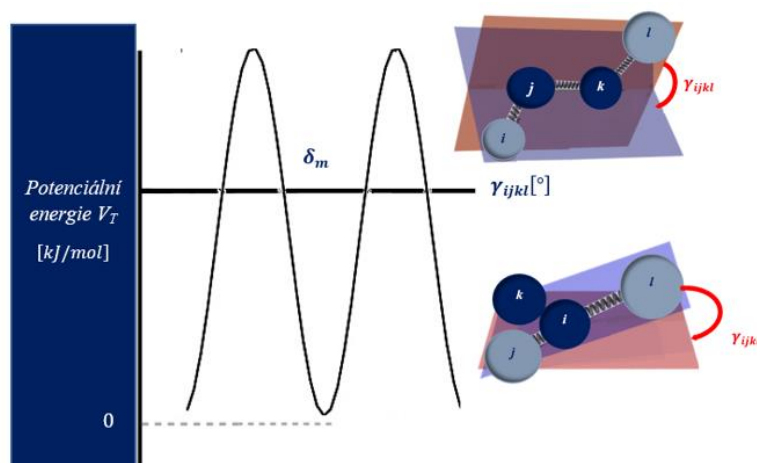
**Obr. 12:** Potenciální energie  $V_A$  ohýbání vazebného úhlu mezi atomy  $i, j, k$ . Obrázek byl nakreslen podle informací dostupných v manuálu Gromacsu 5.1.4 a Atkins' Physical Chemistry 9. edice.

### 4.1.1.3 Torzní potenciál

Torzní potenciál je dvojího typu. Potenciální energie torzí  $V_T$  závisí na velikosti torzního úhlu  $\gamma_{ijkl}$ , který je definován pro čtyři po sobě vázané atomy v molekule (Obr. 13). Je to úhel mezi rovinou, kterou procházejí tyto atomy  $i$ ,  $j$  a  $k$  a rovinou, kterou procházejí atomy  $j$ ,  $k$  a  $l$ . Tuto závislost lze popsat např. rozvojem periodických kosinových funkcí. V rovnici (4.8) potom konstanta  $k_{ijkl}^{\phi,m}$  představuje torzi  $\gamma_{ijkl}$  určité kombinace atomů  $i$ ,  $j$ ,  $k$ ,  $l$  a  $m$  je počet minim této funkce. Opět existuje více modelů pro popis této energie (manuál Gromacsu 5.1.4).

Dihedrální úhel závisí na třech atomech umístěných kolem čtvrtého atomu. Rozdíl mezi torzním a dihedrálním úhlem je v definici úhlu torze potenciálové funkce (manuál Gromacsu 5.1.4). Ten může být ale eliminován vhodnou matematickou úpravou.

$$V_T = \sum_m k_{ijkl}^{\phi,m} [1 + \cos(m\gamma_{ijkl} - \delta_m)] \quad (4.8)$$



**Obr. 13:** Potenciální energie  $V_T$  torzních a distorzních úhlů. Tvorba obrázku byla částečně inspirována ilustrací v <http://cbio.bmt.tue.nl/pumma> (k 5.8.2017). Obrázek byl dále doplněn podle informací v manuálu Gromacsu 5.1.4 a Atkins' Physical Chemistry 9. edice.

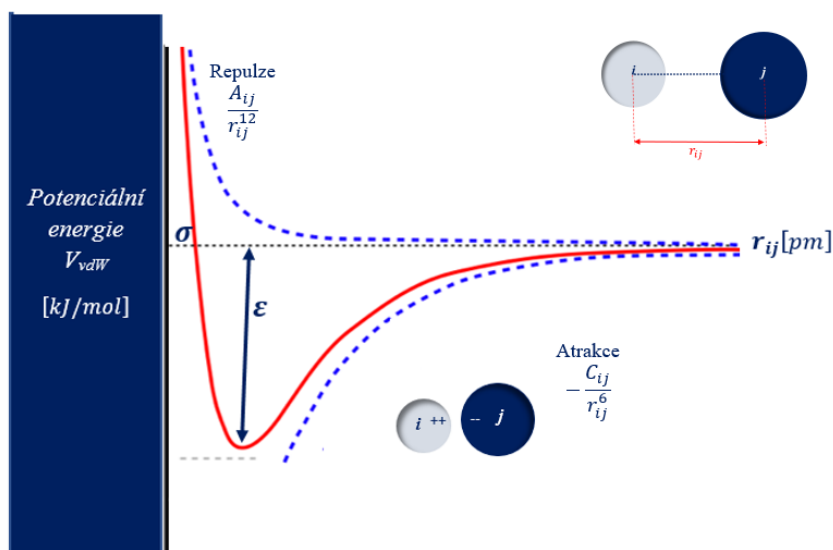
### 4.1.1.4 Van der Waalsovy síly

Van der Waalsovy síly popisují atrakci, resp. repulzi mezi elektroneutralními atomy či molekulami. Existuje několik typů těchto sil. Jsou to Londonovy disperzní síly, indukční síly vyžadující permanentní dipól a síly polárních molekul coulombické povahy. Londonovy disperzní síly působí na krátkou vzdálenost. To je dáno tím, že v definičním vztahu pro tuto sílu je ve

jmenovateli 6. mocnina vzdálenosti. Londonova atrakce se začne projevovat díky fluktuacím v rozložení elektronové hustoty kolem jádra atomu. V okamžiku, kdy dojde k dočasné akumulaci většiny elektronové hustoty na jedné straně atomu, vzniká přechodný dipól. Ten okamžitě indukuje dipól v sousedním atomu, ve kterém je pak nahromaděna elektronová hustota na opačné straně. Tím dochází k přitahování mezi přechodným a indukovaným dipólem. Londonova repulze (Obr. 14) nastává v případě přiblížení dvou atomů až na tak blízkou vzdálenost, že se začnou odpuzovat jejich elektrony v atomových obalech (Stone 2013). Tuto závislost lze popsat např. Lennard-Jonesovým potenciálem 12-6 (Lennard-Jones, 1924).

$$V_{vdW} = 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (4.9)$$

V této aproximační rovnici (4.9)  $V_{vdW}$  zastupuje energii Londovských disperzních sil, resp. představuje minimální energii potenciálové jámy pro dva atomy  $i, j$  ve vzdálenosti  $r$ .  $\varepsilon$  určuje hloubku potenciálové jámy v poloze  $r_{min}$ ,  $\sigma$  pak vzdálenost, ve které je potenciál nulový. Člen v rovnici s dvanáctou mocninou odpovídá repulzi, záporný člen s šestou mocninou potom atrakci. Šestá mocnina zde vystupuje z definiční rovnice van der Waalsovy síly (Lennard-Jones 1924, Rahman 1964, Stone 2013, manuálu Gromacsu 5.1.4).



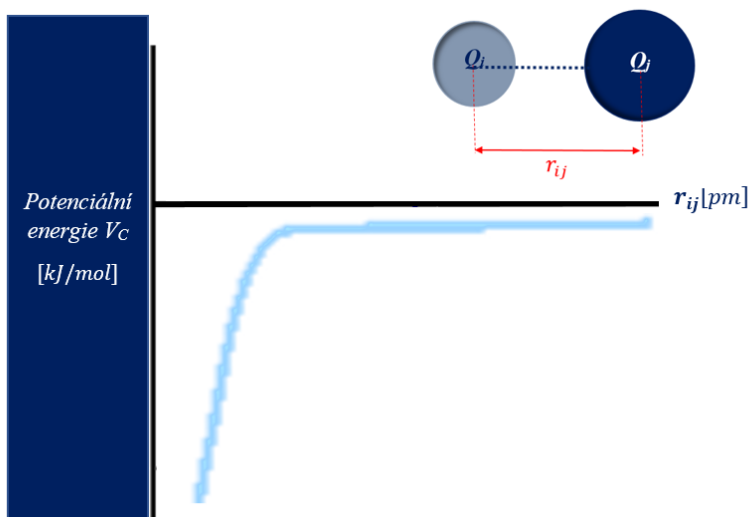
**Obr. 14:** Potenciální energie  $V_{vdW}$  van der Waalsových interakcí mezi atomem  $i$  a  $j$ . Obrázek byl nakreslen podle informací obsažených v manuálu Gromacsu 5.1.4 a v Atkins' Physical Chemistry 9. edice.

#### 4.1.1.5 Elektrostatické interakce

Elektrostatické interakce (Obr. 15) jsou dalekodosahového charakteru a popisují přitahování, resp. odpuzování, opačně resp. souhlasně nabitých bodových nábojů (tzn. atomů). Vychází z Coulombova zákona. V rovnici popisující tuto interakci je součin dvou navzájem působících bodových nábojů  $Q_i$  a  $Q_j$  nepřímo úměrný konstantně z Coulombova zákona a jejich vzdálenosti  $r_{ij}$ . Dalekodosahový charakter působení těchto interakcí tedy jasně vyplývá z této rovnice (4.10), která obsahuje ve jmenovateli pouze první mocninu  $r_{ij}$  – na rozdíl od rovnice pro vdW interakce, která obsahuje ve jmenovateli šestou mocninu vzdálenosti  $r_{ij}$  (Stone 2013, manuálu Gromacsu 5.1.4, ).

$$V_C = \frac{1}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0} \cdot \frac{Q_i Q_j}{r_{ij}} \quad (4.10)$$

V rovnici (4.10)  $V_C$  zastupuje elektrostatickou interakci Coulombova typu,  $\epsilon_0$  je permitivita vakua,  $\epsilon_r$  je relativní permitivita prostředí,  $Q_i$  a  $Q_j$  jsou náboje atomu  $i$  a  $j$ ,  $r_{ij}$  je pak vzdálenost mezi těmito atomy (bodovými náboji).



**Obr. 15:** Potenciální energie  $V_C$  elektrostatických interakcí mezi kationtem  $Q_i$  a aniontem  $Q_j$ . Obrázek byl nakreslen podle informací dostupných v Stone 2013, manuálu Gromacsu 5.1.4 a Atkins' Physical Chemistry 9. edice.

## 4.1.2 Výpočetní algoritmus MD

Jak už bylo uvedeno výše, MD simulace vychází z 2. Newtonova zákona, ve kterém  $\vec{F}$  je působí síla,  $\vec{a}$  zrychlení a  $m$  hmotnosti tělesa. Tento zákon lze jednoduše zapsat touto rovností (4.11):

$$\vec{F} = m\vec{a} \quad (4.11)$$

Z tohoto zákona vyplývá, že v systému o určitém počtu částic  $N$  (počtu atomů, molekul), který je popsán potenciálovou funkcí s parametry (FF), se bude každá částice  $N$  pohybovat určitou rychlostí  $\vec{v}$ . Pro popis částic  $N$  v 3D prostoru se volí kartézský souřadnicový systém. Tento výpočet pohybu částic  $N$  v čase  $t$ , tj. jejich trajektorie, může být získán vyřešením Newtonových pohybových rovnic. To jsou diferenciální rovnice a aby jejich přirozený charakter vynikl, je třeba do rovnice (4.11) dosadit za zrychlení  $\vec{a}$  z jeho definičního vztahu.

$$\vec{F} = m \frac{d(\vec{v})}{dt} = m \frac{d^2(\mathbf{r})}{dt^2} \quad (4.12)$$

Z rovnice (4.12) je už naprosto patrné, že zrychlení  $\vec{a}$  je pouze první derivací rychlosti či druhou derivací dráhy podle času. K vyřešení pohybových rovnic je nutné použít integraci metodou konečných diferencí, protože příliš mnoho částic v systému nedovoluje vyřešit integraci analyticky. Tudíž je výhodné pohybové rovnice nejprve aproximovat Taylorovým rozvojem a vyřešit navrženým výpočetním algoritmem, např. Verletovou metodou (manuál Gromacsu 5.1.4, <http://marge.uochb.cas.cz/~jungwirt/kkmd.pdf>, k 14.8.2017).

Verletova metoda (Verlet 1967) využívá k výpočtu nové polohy atomu  $\mathbf{r}$  ( $\mathbf{r} = r_x \ r_y \ r_z$ ) v čase  $t + \Delta t$  Taylorův rozvoj souřadnic druhého řádu vpřed a vzad v čase. Rovnice (4.13) tedy popisuje souřadnice atomu v kroku  $t + \Delta t$ . Rovnice (4.14) pak popisuje souřadnice atomu v kroku  $t - \Delta t$ . Funkce (4.15) je pak jejich součtem.

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \Delta t \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 \vec{a}(t) \quad (4.13)$$

$$\mathbf{r}(t - \Delta t) = \mathbf{r}(t) - \Delta t \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 \vec{a}(t) \quad (4.14)$$

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \Delta t) + \Delta t^2 \vec{a}(t) \quad (4.15)$$

U prvního kroku výpočtu není známa poloha atomu v čase  $t - \Delta t$  a rychlosti, proto se k řešení pro první případ používá zkrácený Taylorův polynom (4.16). Rychlosti jsou pak pouze odhadovány na základě výpočtu pozice atomu v dalším časovém kroku (Verlet 1967, manuál Gromacsu 5.1.4., <http://marge.uochb.cas.cz/~jungwirt/kkmd.pdf>, k 14.8.2017), viz rovnice (4.17)

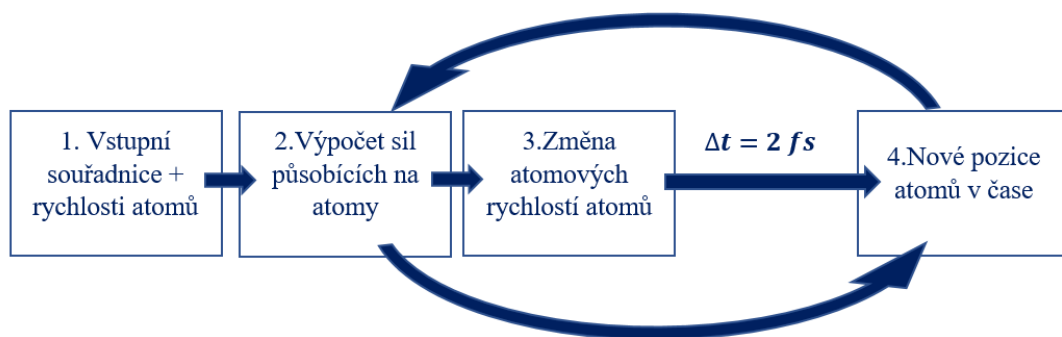
$$\mathbf{r}(-\Delta t) = \mathbf{r}(0) - \Delta t \vec{v}(0) + \frac{1}{2} \Delta t^2 \vec{a}(0) \quad (4.16)$$

$$\vec{v}(t) = \frac{\mathbf{r}(t + \Delta t) - \mathbf{r}(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad (4.17)$$

K integraci Newtonových pohybových rovnic se v MD programech obvykle používá např. „Leap-frog algoritmus“ (Gromacs manuál 5.1.4.) schematicky zobrazený na Obr. 16 a Obr. 17, který je pouze modifikací algoritmu Verletova (<http://marge.uochb.cas.cz/~jungwirt/kkmd.pdf>, k 14.8.2017).

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) - \Delta t \vec{v}(t + \frac{1}{2} \Delta t) \quad (4.18)$$

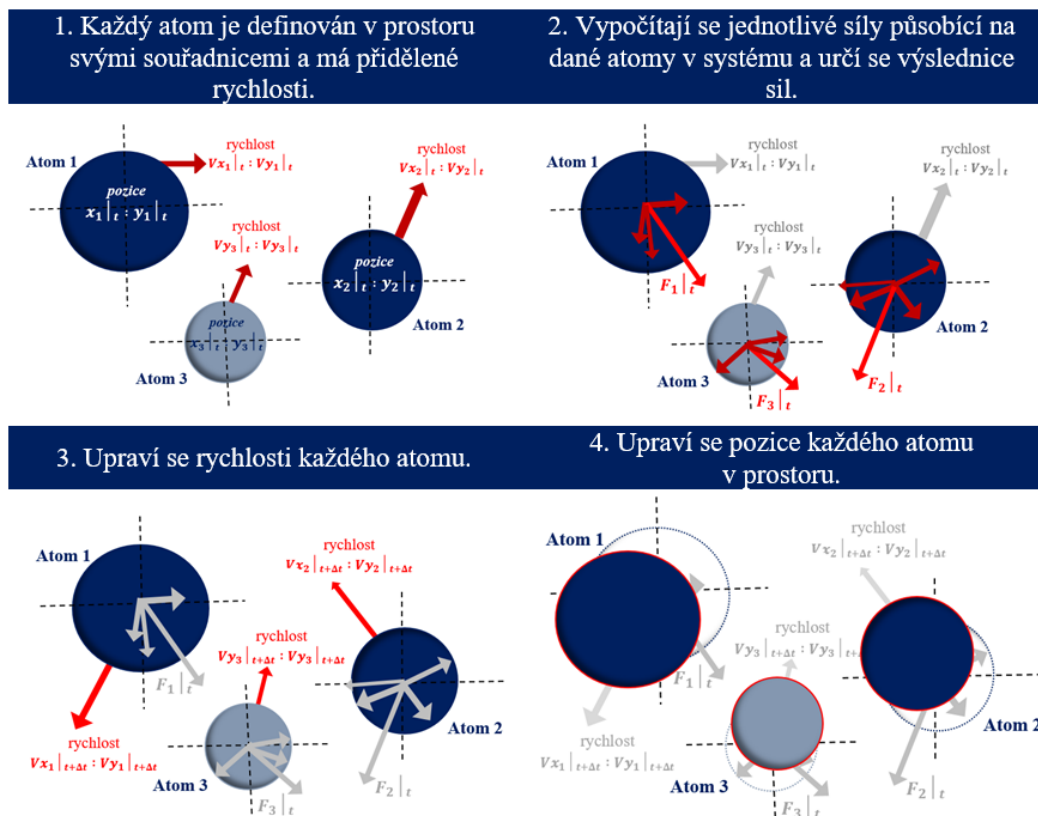
$$\vec{v}(t + \frac{1}{2} \Delta t) = \vec{v}(t - \frac{1}{2} \Delta t) + \Delta t \vec{a}(t) \quad (4.19)$$



**Obr. 16:** Schéma „Leap-frog“ algoritmu. Z počátečních atomových poloh v 3D prostoru, rychlostí  $\vec{v}$  těchto atomů a sil  $\vec{F}$ , které v systému působí v daném čase  $t$ , lze vypočítat souřadnice v čase  $t + \Delta t$ . Obrázek byl vytvořen na základě informací v manuálu Gromacsu 5.1.4. a v <http://marge.uochb.cas.cz/~jungwirt/kkmd.pdf>, k 14.8.2017).

Vstupní souřadnice částic  $N$  v 3D prostoru v sobě obsahují informaci o jejich potenciální energii  $E_p$ . Jejich rychlosti jsou dány kinetickou energií  $E_k$ . Celková energie  $E_{celk}$  daného atomu je součtem příspěvků  $E_p$  a  $E_k$ . Pohybem tohoto atomu se jednotlivé složky jeho celkové energie  $E_{celk}$  navzájem přeměňují, tj. změna  $E_p$  vyvolá změnu  $E_k$  a naopak. Z výsledné síly  $\vec{F}$ , dané vektorovým součtem všech interakčních sil jednoho atomu v čase  $t$ , je vypočítáno zrychlení  $\vec{a}$  tohoto atomu. Ze zrychlení  $\vec{a}$  lze poté vypočítat rychlosti  $\vec{v}$  a následně novou polohu atomu v  $r_x$   $r_y$   $r_z$  v novém čase  $t + \Delta t$  (Atkins' Physical Chemistry 9. edice, manuál Gromacsu 5.1.4.).

Hodnota integrační kroku  $\Delta t$  se zadává typicky v rozmezí 1 až 2 fs. Tento čas musí být kratší, než je časová škála nejrychlejšího procesu v systému, jinak bude metoda nestabilní (<http://marge.uochb.cas.cz/~jungwirt/kkmd.pdf>, k 14.8.2017). Tzn. pokud např. C-H vazba vibruje s periodou 10 fs, pak by bylo správné zvolit 1 fs jako  $\Delta t$ . Ovšem ve většině klasických MD simulací lze tyto vibrace omezit použitím vhodného algoritmu. Např. SHAKE (Ryckaert et al. 1977) nebo LINCS (Hess et al. 1998) algoritmus umožňují prodloužení  $\Delta t$  na 2 fs a fixování vazebných délek.



**Obr. 17:** Grafické znázornění „Leap-frog“ algoritmu. Tvorba tohoto obrázku byla inspirována ilustrací z <http://atomsinmotion.com/book/chapter5/md> dostupné k 27.7.2017.



### 4.1.3 Ostatní důležité parametry metody

#### 4.1.3.1 Periodické okrajové podmínky a interakční cut-off

V MD simulaci je obvykle studovaná molekula obklopena simulačním boxem (manuál Gromacsu 5.1.4), který se může např. naplnit vodou. Aby tato molekula nebyla ovlivněna interakcí se stěnami boxu, zavádí se tzv. periodické okrajové podmínky boxu. Tento pojem znamená, že box, ve kterém je solvatovaná molekula, je obklopen svými replikami. Praktický důsledek je ten, že se solvatovaná molekula nachází v nekonečném rozpouštědle. Jakmile jedna část molekuly začne procházet stěnou simulačního boxu, pak se ta samá její část objeví na opačné straně boxu. Kdyby se zvolil příliš malý simulační box, molekula by poté mohla skrze periodické okrajové podmínky boxu začít interagovat sama se sebou. Proto existují určitá omezení, jak této situaci předejít. Simulační box nesmí být v žádném směru menší, než je součet délky nejdelší strany studované molekuly a dvojnásobné hodnoty cut-off.

Interakční cut-off pro krátkodosahové interakce znamená, že molekuly v boxu jsou schopny „vnímat“ potenciálního interakčního partnera pouze do určité vzdálenosti  $r_c$  (např. 1 nm). Tato vzdálenost vychází z předpokladu, že tyto interakce slábnou rychleji než  $1/r^3$ . Např. Lennard-Jonesové interakce velmi rychle vyhasínají s  $1/r^6$ , ale Coulombické interakce se vzdáleností slábnou velmi pomalu. Konkrétně je to s  $1/r$  pro náboj-náboj,  $1/r^2$  pro náboj-dipól,  $1/r^3$  pro dipól-dipól. Tyto interakce nelze pro větší vzdálenost jednoduše zanedbat (<http://marge.uochb.cas.cz/~jungwirt/kkmd.pdf> (k 14.8.2017)). Pro omezení jejich dalekohodosahového „vnímání“ se proto používá např. metoda Ewaldovy sumace (Ewald 1921). Ta rozloží Coulombovský potenciál na součet interakcí krátkodosahových konvergujících v reálném prostoru, a na součet interakcí dalekohodosahových, konvergujících ve Fourierově prostoru (Karasawa a Goddard 1989; Essman et al. 1995).

#### 4.1.3.2 Barostat a termostat

V běžném biologickém i chemickém výzkumu je daný systém obvykle studován při určité teplotě a tlaku. Jedná se o tzv. izotermicko-izobarický soubor (NPT). V tomto souboru je během MD simulace konstantní látkové množství, teplota a tlak. Tlak je udržován na požadované hodnotě pomocí barostatu, teplota pomocí termostatu (Nosé 1984). Existuje několik typů barostatů i termostatů. Já ve své práci používala např. Parinello-Rahman barostat (Parinello a Rahman 1981) a v-rescale termostat (Bussi et al. 2007). Během mých MD simulací byla pak teplota udržována na 310 K a tlak na 1 baru.

Další často používané termostaty a barostaty v MD simulacích jsou např. Berendsenův (Berendsen et al. 1984), Andersonův (Andersen 1980), Nosé-Hoverův (Nosé 1984, Tuckerman et al. 1992, Martyna et al. 1992).

#### **4.1.3.3 Rovnovážné MD simulace**

Pokud jsou k dispozici počáteční geometrie struktur, nebo jsou struktury vytvořeny podle experimentálních dat, pak jim lze při určité teplotě přiřadit rychlosti z Maxwellova-Boltzmannova rozdělení. Následně je třeba provést ekvilibraci této struktury. Tzn. spustit MD výpočet na kratší dobu (<http://marge.uochb.cas.cz/~jungwirt/kkmd.pdf> (k 14.8.2017)).

Pokud je chování struktury v MD simulaci rovnovážné, lze ho ovzorkovat už během MD výpočtu. Po dokončení celé simulace se pak analyzuje rovnovážné chování a vzorkuje napříč touto jednou trajektorií <http://marge.uochb.cas.cz/~jungwirt/kkmd.pdf> (k 14.8.2017). O tom, jak moc rovnovážně se daná struktura chová, informuje např. analýza RMSD.

Pokud v MD simulaci dochází k nerovnovážnému procesu, je třeba vytvořit sadu různých počátečních stavů dané struktury a vypočítat soubor MD trajektorií, a ty poté statisticky vyhodnotit.

#### **4.1.4 Použitý software a hardware pro MD simulace**

Všechny MD simulace byly připravovány a vypočítávány programovým balíkem Gromacs verze 4.6.5 a 4.6.7 (Hess et al. 2008) pod operačním systémem Linux Ubuntu 14.04.5 LTS. Silové pole pro peptidy a stejně tak většina používaných analýz pochází standardně z programů obsažených v Gromacsu.

Pro vizualizaci molekul bylo primárně využíváno programu VMD verze 1.9.1 a 1.9.2 (Humphrey et al. 1996) dostupného volně ke stažení po registraci na stránkách <http://www.ks.uiuc.edu/>. V některých případech byla použita studentská verze Pymolu (DeLano 2002) dostupná z <https://www.pymol.org/>.

Pro grafickou reprezentaci výsledných dat byl použit program Grace verze 2.3.4 (Plasma Laboratory of Weizmann Institute of Science 2004) dostupný na <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>. Data byla vyhodnocena v příkazové řádce příkazem `xmgrace analysa.xvg -free -legend load`. Pro tvorbu histogramů a normalizovaných hustotních profilů byl použit Origin8 (<http://www.originlab.com/>; May a Stevenson 2009). Origin8 software není volně ke stažení, ale většinou jím disponuje každá chemická laboratoř.

Skripty pro výpočet analýz a spuštění simulací byly obvykle rovnou psány v jazyce Bash. Python byl primárně využíván zejména k tvorbě histogramů z analýzy *g\_bundle* poskytující časový průběh sklonu peptidu v membráně. Program *dssp*, použitý pro analýzu sekundární struktury, byl stažen z <http://www.cmbi.ru.nl/dssp.html> a doinstalován.

Přehled využívaných strojů v této práci je uveden v Tab. 5.

Použité stroje a výpočetní klastry						
Název stroje	CPU jádra	RAM [GB]	Procesor	Použití	Rychlost výpočtu	<i>N</i> souběžných úloh
Kohn ÚFCH JH AV ČR	336	128	1 uzel: 2x CPU Intel Xeon E5-2667v3 3.2 GHz (16 jader)	Výpočet 200ns a 500ns trajektorií	30 ns / den (pro 1 peptid v POPC)	2-3
Bose ÚFCH JH AV ČR	280	48	1 uzel: 2x CPU Intel Xeon X5687 3.6 GHz (8 jader)	Výpočet 200ns a 500ns trajektorií	9,5 ns / den (pro 1 peptid v POPC)	8
Planck ÚFCH JH AV ČR	3	8	Intel Core i5-4460 3.20 GHz (3 jadra)	Příprava simulačních systémů, 100 ps ekvilibrace, analýzy	-	-
Doom <sup>2</sup> METACENTRUM	480	64	Intel Xeon E5-2650v2 2.60 GHz (16 jader); 2 GPU	Výpočet 200ns a 500ns trajektorií	7 ns / den (pro 1 peptid v POPC)	6
Galileo osobní notebook	4	8	AMD A10-7300 Radeon R6 1,9 GHz (4 jadra)	Grafické a vizuální reprezentace trajektorií	-	-

**Tab. 5:** Přehled využívaných strojů v této práci. Tabulka obsahuje technické údaje jako CPU, RAM a typ procesoru daného počítače či klastru. Dále obsahuje informace o tom, na co byl který stroj v této práci využíván, obvyklou dobu výpočtu MD simulace chování 1 peptidu v POPC membráně, a počet (*N*) výpočetních úloh, které byly obvykle souběžně spuštěny.

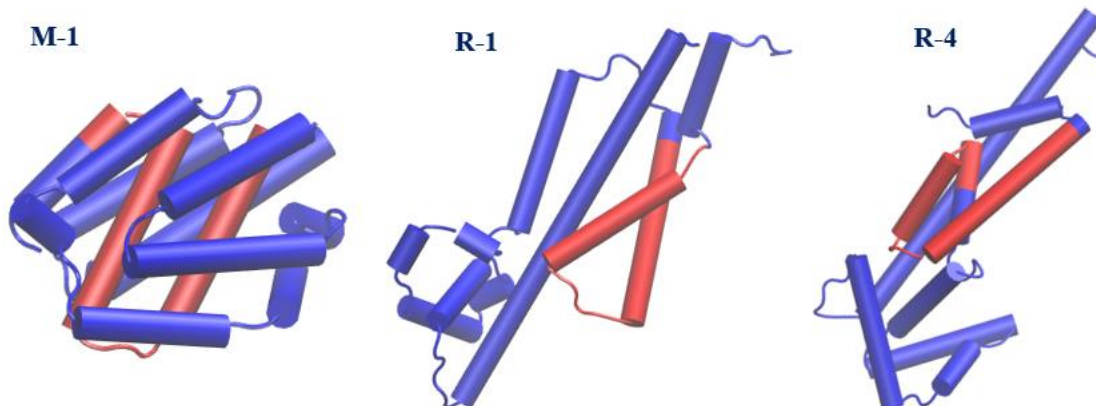
## 4.1.5 Vstupní souřadnice a silová pole

### 4.1.5.1 CTD kolicinu U

Počáteční souřadnice 3D struktury CTD kolicinu U používané v těchto MD simulacích mi byly poskytnuty Laboratoří fyziologie bakterií spadající pod katedru Genetiky a mikrobiologie PřF UK v Praze. Byl mi poskytnut model CTD kolicinu U v solubilním stavu ze softwaru iTaser (M-

<sup>2</sup> Výpočetní rychlost strojů Metacentra je úměrná vděčnosti uživatele, kterou vyjádřil svým poděkováním v publikaci. S přibývajícím publikacemi se výpočetní rychlost uživateli zvyšuje.

1) a dva modely možných struktur CTD kolicinu U v membráně náhodně vygenerované softwarem Rosetta, které jsou v textu dále označeny jako R-1 a R-4. Všechny používané modely CTD kolicinu U jsou zobrazeny níže v Obr. 18.



**Obr. 18:** Výchozí struktury pro MD simulace. M-1 představuje CTD kolicinu U v solubilní stavu (iTasser), R-1 a R-4 jsou náhodně vygenerované možné struktury CTD v membráně (Rosetta). Obrázek vznikl za použití programu VMD. Zobrazení struktur je Cartoon. Barevné kódování: amfipatické helixy H1-H7, H10 modře, hydrofobní helixy H8 a H9 červeně.

Předpokládaným cílem DP práce bylo ověřit chování jednotlivých helixů z modelu R-4, jehož struktura CTD v membráně se zdá být více pravděpodobná. Z této struktury tedy byly pro MD simulaci vybrány pouze sekvence odpovídající pravděpodobným helixům CTD v membráně v otevřeném stavu póru. Metodický postup na vygenerování struktur peptidů z celé CTD kolicinu je v Příloze.

Při volbě sekvencí pro jednotlivé helixy CTD kolicinu U a H1 ostatních PK jsem zohledňovala:

- článek Smajs et al. 1997
- MSA helixů CTD v solubilním stavu PK (Obr. 3)
- modely pravděpodobných helixů v otevřeném stavu póru
- nepublikované výsledky Mgr. Terezy Dolejšové

Jelikož jsou některé helixy velmi krátké, nebo se modely neshodují, přidala jsem obvykle ke zvolené sekvenci ještě 1-2 další aminokyseliny z N-, C-konce navíc. V Tab. 6 je uveden celkový přehled zvolených sekvencí pro jednotlivé helixy v rámci celé sekvence CTD. Vlastnosti zvolené sekvence jednotlivých helixů jsou shrnuty v Tab. 7.

Zvolené sekvence helixů CTD kolicinu U pro MD simulace					
Helix H1		Helix H2			
KAND	EKAVLTKASEIIISVGDKAGEY	LGD	KYKVLRSREIADNIKN	FQGK	TIRSYD
Helix H3		Helix H4		Helix H5	
EAMASVNLMA	NDL	KINAA	DRDAIVNAWKA	DAEDMGNKFAALGK	TFKA
Helix H6		Helix H7		Helix H8	
ADYVMKANNVREKSIEGYQT	GNWGPLMLEI	ESWVLS	GISAVALSFFSAI		
Helix H9			Helix H10		
FGTFAML	VFSTSLAGILAVILAGLVGAL	IDDNFVDKLNNEI	IRPAY		

**Tab. 6:** Celkové schéma zvolených sekvencí pro MD simulace jednotlivých helixů v membráně POPC. Červenou barvou jsou znázorněny kladně a modrou záporně nabitě „helixy“ CTD kolicinu U. Žlutě je označena sekvence s celkovým neutrálním nábojem. Zvolená sekvence H1 a H2 obsahuje překryv v LGD, což je zobrazeno zelenou barvou.

Zvolené sekvence pro MD simulaci helixů CTD kolicinu U v POPC					
helix	Sekvence	Model	Residua	$q$ (e)	n AMK
H1	ANDEKAVLTKASEIIISVGDKAGEYLGD	R-4	7-34	-3	28
H2	LGDKYKVLRSREIADNIKN	R-4	32-49	+1	18
H3	TIRSYDEAMASVNLMA	R-4	54-70	0	17
H4	KINAADRDAIVNAWKA	R-4	75-90	+1	16
H5	DAEDMGNKFAALGK	R-4	92-105	-1	14
H6	AADYVMKANNVREKSIEGYQT	R-4	109-129	0	21
H7	NWGPLMLEIESWVLS	R-4	131-145	-2	15
H8	IASAVALSFFSAIFGTFAML	R-4	147-166	0	20
H9	VFSTSLAGILAVILAGLVGAL	R-1	168-188	0	21
H10	IDDNFVDKLNNEI	R-4	189-201	-3	13

**Tab. 7:** Schéma zvolených sekvencí pro MD simulace jednotlivých helixů v membráně.

Později se při generování silového pole a nového souboru souřadnic, ukázalo, že model R-4 obsahoval chybu ve Vand der Waalsovském překryvu atomů. Došlo k tomu pravděpodobně při opravě struktury např. přidáním některého chybějícího vodíku, ev. nepřirozeného terminálu. Tato chyba se vyskytuje v helixu H9, který ani po částečné redukci chyby různými postupy v membráně nevykazoval helicitu. Jeho chování bylo podezřelé a způsobené pravděpodobně mou snahou o obejít chybu struktury. Proto byly ke studiu z tohoto modelu R-4 použity zvolené úseky sekvencí odpovídající pouze helixům H1-H8 a H10. Pro MD simulaci obsahující H9 byly využity souřadnice z modelu R-1. Jedná se o MD simulace samotného peptidu H9 ve vodě a v POPC membráně, a dále peptidu H8-H9.

Celá CTD modelu M-1 a R-1 byla využita pro MD simulaci pohybu těchto domén v roztoku při 310 K. M-1 model také sloužil jako zdroj sekvence a struktury pro H8-H9-H10, H1-H2-H3-H4, H4-H5-H6-H7, H7-H8-H9-H10. Také byl použit pro MD simulaci šesti peptidů H1 v POPC membráně současně. Nespornou výhodou tohoto modelu je jeho kompaktnost, tj. helixy, které jej tvoří, se snáze uměle vloží do malé simulované membrány. Navíc konformace, kterou zaujímá peptid H9-H10 v tomto modelu před vložením do membrány, se mi zdála k tomuto účelu mnohem přirozenější. Proto Rosettové modely pro MD simulace vícero helixů v membráně nebyly již využívány, s výjimkou MD simulací H1-H2 a H2-H3 (R-4), H8-H9 (R-1), které byly vypočítány dříve, než jsem získala M-1 model. Kompletní přehled sekvencí zvolených pro další studium chování helixů z CTD kolicinu U je zapsán v Tab. 8. Rozmezí zvolené sekvence označuje vždy číslo 1. a 2. residua daného modelu.

Zvolené sekvence pro MD simulaci segmentu CTD kol. U v POPC					
Umělý peptid	Lokalizace při spuštění	Model	Resid	$q$ (e)	n AMK
H1-H2	H1 membrána, H2 vodní fáze	R-4	1-51	-2	51
H2-H3	membrána	R-4	35-74	+2	40
H8-H9	membrána	R-1	143-188	0	46
H9-H10	membrána	M-1	168-200	-2	33
H8-H9-H10	vodní fáze	M-1	140-200	-2	61
H1-H2-H3-H4	membrána, vodní fáze	M-1	1-95	-2	95
H4-H5-H6-H7	membrána, vodní fáze	M-1	70-150	-2	81
H7-H8-H9-H10	membrána, vodní fáze	M-1	124-200	-4	77
H1, H3, H5, H10	membrána	M-1	Viz. Tab. 7	-7	72
H1 6x	membrána	M-1	1-28 (6x)	-18	168

**Tab. 8:** Schéma zvolených sekvencí pro MD simulace jednotlivých segmentů CTD kolicinu U.

#### 4.1.5.2 CTD ostatních pórotvorných kolicinů

Počáteční souřadnice 3D struktur CTD ostatních PK (A, B, N, S4, E1 a Ia) byly získány z PDB ve formátu *.pdb* a jsou zobrazeny v úvodní kapitole této práce. Stažené struktury, které se podařilo experimentálně získat pomocí krystalografie, obvykle obsahovaly současně i jinou doménu kolicinu, nebo ev. dvě stejné domény v případě kolicinu A. Proto byl následně ze stažených struktur ve VMD zvolen pouze úsek odpovídající sekvenci CTD. A pro MD simulaci celé CTD kolicinu A (Tab. 9) ve vodě byl ze struktury 1COL simulován pouze jeden publikovaný řetězec – konkrétně A.

Vlastnosti sekvencí CTD A a U pro MD simulace ve vodě				
CTD PK	Model	Resid	$q$	n AMK
A	1COL:A	5-201	-3	197
U	U-R1	1-206	-5	206
U	U-M1	1-200	-4	200

**Tab. 9:** Přehled vlastností zvolených sekvencí pro MD simulace CTD PK ve vodě.

Pro simulaci H1 dalších PK byla na základě MSA zvolena sekvence odpovídající již vybrané a simulované sekvenci H1 kolicinu U (Tab. 10).

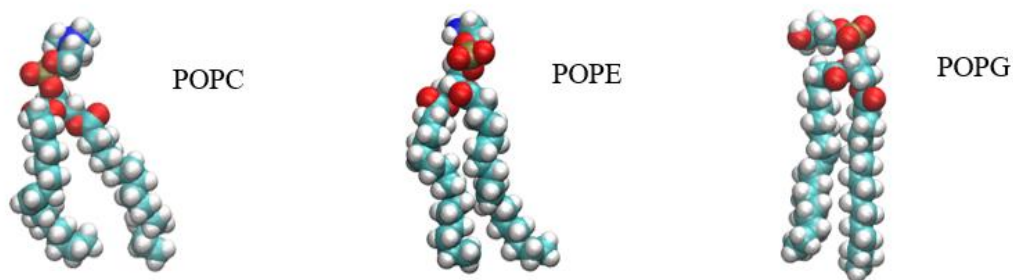
Zvolené sekvence pro MD simulaci helixu H1 CTD PK v POPC					
CTD	Sekvence H1	Struktura	Resid	$q$	n AMK
A	KAKD ERELLEKTSE LIAGMGDKIG EHLGDKYKAI	1COL:A	5-32	-4	28
S4	RDRI QSDVLNKAEE VISDIGNKVG DYLGDAYKSL	3FEW:X	300-327	-3	28
B	QEND EKTVLTKTSE VIISVGDKVG EYLGDKYKAL	1RH1:A	315-342	-4	28
U	KAND EKAVLTKASE IISVGDKAG EYLGDKYKVL	R-4	7-34	-3	28
N	KEKN EKEALLKASE LVSGMGDKLG EYLGDKYKNV	1A87:A	189-216	-2	28
E1 <sup>3</sup>	QNNL LNSQIKDAVD ATVSFYQTLT EKYGEKYSKM	2I88:A	345-365	-2	21
Ia	RKQD ELKATKDAIN FTTEFLKSVS EKYGAKAEQL	1CII:A	442-469	0	28

**Tab. 10:** Přehled zvolených sekvencí pro MD simulace H1 ostatních PK v membráně POPC. Modře vyznačená oblast odpovídá sekvenci v MD simulaci. Vlastnosti sekvence H1 kolicinu U jsou zde pro porovnání také uvedeny. Zdroj struktury o dané sekvenci pochází z PDB a v tabulce je uvedeno PDB ID. Také je zapsáno první a poslední residuum, které této sekvenci odpovídá.

#### 4.1.5.3 Lipidová membrána POPC

Počáteční souřadnice 3D struktury lipidové dvojvrstvy pro MD simulace včetně jejího silového pole mi byly poskytnuty mým konzultantem z Ústavu Fyzikální chemie JH AV ČR. Jedná se o membránu obsahující 128 molekul lipidů *palmitoyl-oleoyl-glycero-phosphocholinů* (POPC, Obr. 19, 64 lipidů v každé monovrstvě membrány), a 5117 molekul vody. V textu je tato membrána označována už jen zkráceně jako POPC membrána.

<sup>3</sup> PDB souřadnice této struktury CTD obsahují pouze fragment H1. Jedná se o krátký helix H1 a jeho souřadnice počínají ILE345. Z toho důvodu nemohla být provedena MD simulace helixu H1 kolicinu E1 v odpovídající délce sekvence ostatních H1 PK.



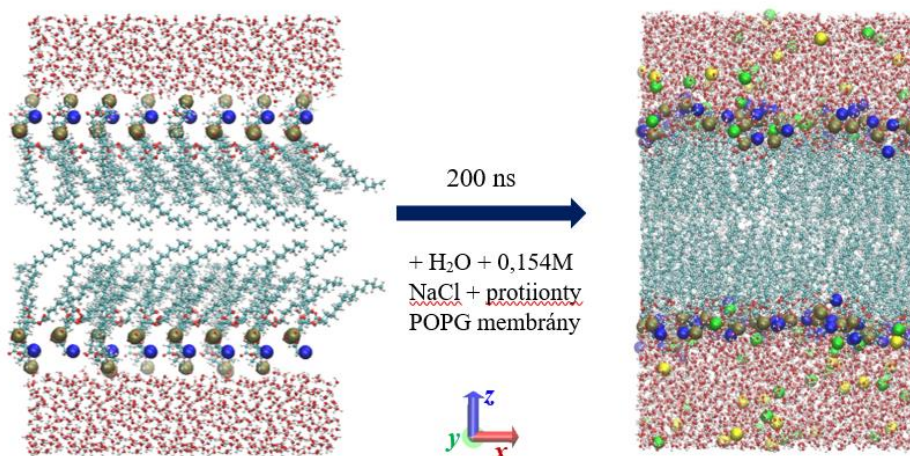
**Obr. 19:** Jednotlivé lipidy použité pro MD simulace peptidů z CTD PK v membránách POPC a membráně POPE:POPG. Tyrkysová barva značí uhlíkový řetězec MK, červená atomy kyslíku, modrá atomy dusíku, zlatá atomy fosfátu, bílá atomy vodíku. Zobrazení je typu VDW.

Pro tuto membránu jsme se rozhodli, protože je dobře strukturně definovaná, a v MD simulacích s ní jsou velmi dobré praktické zkušenosti. Její spolehlivost jsem si již mohla ověřit ve svém předchozím studiu.

#### 4.1.5.4 Lipidová membrána POPE:POPG v 0.154M NaCl

Z úvodních odstavců této práce lze dedukovat možnost, že chování helixů CTD PK se bude lišit v závislosti na typu použité membrány. Z tohoto důvodu jsem se rozhodla tuto hypotézu ověřit pro helix H1, tím že připravím *in silico* membránu, jež by měla být pro kolicin přirozená. Jedná se o membránu tvořenou takovými lipidy, které by měly přibližně odpovídat reálnému složení vnitřní lipidové membrány *E. coli* při 310 K. V článku Morein et al. 1996 je stanovené složení lipidových hlaviček při 310 K pro membránu *E. coli* v poměru  $75 \pm 1 \% PE : 22 \pm 1 \% PG : 6 \pm 2 DPG$ . Dále autoři v článku analyzovali vyskytující se MK, přičemž největší zastoupení v 310 K ve vnitřní membráně bakterie měly MK 16:0 (42,8 %) a 16:1c9 (31,9 %). Z tohoto důvodu jsem se rozhodla membránu postavit z lipidů POPE a POPG (Obr. 19) v  $\beta$ -verzi MemBuildru (Ghahremanpour et al., 2013), dostupné k 27.7.2017 na webové adrese <http://bioinf.modares.ac.ir/software/mb2/>. Silová pole pro lipidy POPE a POPG byla stažena z <http://www.fos.su.se/~sasha/SLipids/Downloads.html>. Detailní návod přípravy této membrány je uveden v Příloze. Tato automaticky vygenerovaná membrána s požadovaným množstvím POPE a POPG je na Obr. 20.





**Obr. 20:** Vygenerovaná membrána přes MemBuildr na <http://bioinf.modares.ac.ir/software/mb2/> (k 27.7.2017) s definovaným zastoupením lipidů POPE a POPG (vlevo). Dále byla upravená tak, aby byla použitelná k MD simulaci s H1 (vpravo). Barevné kódování a zobrazení: atomy N molekul POPC (modře, VDW), atomy P molekul POPC (zlatě, VDW), ionty  $\text{Na}^+$  (zeleně VDW), ionty  $\text{Cl}^-$  (žlutě, VDW), atomy kyslíku molekul vody (červeně, CPK), C-řetězce MK (tyrkysově, CPK).

Pro MD simulaci chování H1 v této membráně ji však bylo třeba následně upravit. Byly smazány automaticky vygenerované ionty, přidány molekuly vody, přidána sůl v koncentraci 0.154M NaCl, a přidány protiionty k POPG. Poté byla membrána spuštěna při standardních podmínkách na 200 ns. Snímek z posledního kroku MD simulace byl použit jako výchozí pro následnou MD simulaci H1 v této membráně.

#### 4.1.5.5 Rozpouštědlo

Molekuly vody pro simulaci peptidů v membráně POPC byly již zahrnuty do souřadnicového souboru struktury lipidové membrány POPC, která mi byla poskytnuta konzultantem. Molekuly vody pro membránu POPE:POPG a pro MD simulaci H1-H2 z modelu R-4 byly do souboru přidány v Gromacsu nástrojem *genbox*. Peptid rozpuštěný ve vodě, ev. CTD ve vodě, byl připraven v Gromacsu pomocí nástroje *editconf*, *genbox* a *genion*. Použit byl model spc216 molekul vod a TIP3P silové pole.

#### 4.1.6 Parametry pro MD simulaci

K MD simulacím byl použit izobaricko-izotermický (NPT) soubor. Systém pro simulaci byl ohraničen boxem s periodickými okrajovými podmínkami (pbc). Ve všech případech byla použita *all-atom* simulace, rozpouštědlo bylo explicitně přidané. Velikost pbc boxu na počátku všech simulací peptidů ve vodě a v membráně POPC byla cca 6.45 x 6.45 x 7.5 nm. Velikost boxu na počátku MD simulací celých CTD modelů R-1, M-1 a 1COL se pohybovala kolem 14 x 14 x 15 nm. Použitá cut-off vzdálenost byla 1.0 nm. K výpočtu elektrostatické interakce byla použita metoda PME. K udržování konstantních vazebných délek byla použita metoda LINCS.

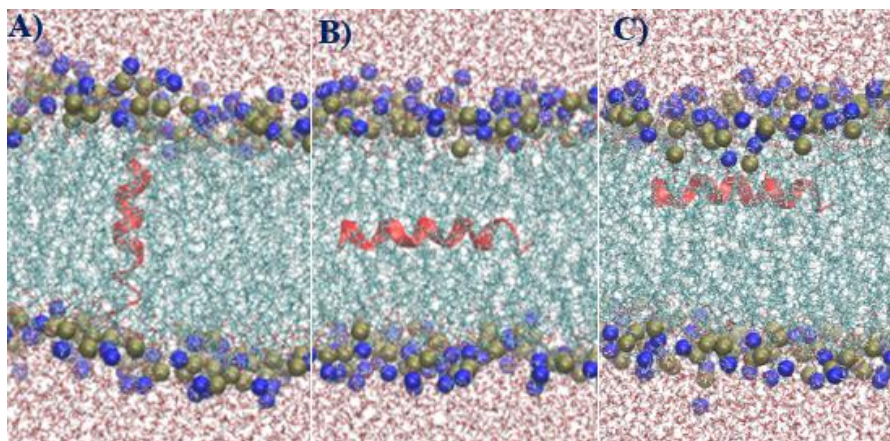
Vše bylo simulováno při teplotě 310 K a tlaku 1.013 bar. Použit byl Parrinello-Rahman barostat a v-rescale termostat. Hodnota časové konstanty pro termostat, tj. relaxační doba, byla 0.5 ps. V MD simulacích peptidů v membráně jsem používala semiizotropické škálování rozměrů pbc boxu, ovšem pro simulace peptidů ve vodě bylo nutné použít škálování izotropické. Semiizotropické škálování a působení tlaku vyvolávalo vlivem pohybu peptidu ve vodě smršťování pbc boxu z jedné strany, což obvykle vedlo až k zastavení simulace. Při semiizotropickém působení se tato simulace předčasně neukončila pouze při použití Berendsenova termostatu a barostatu. Jelikož však Berendsenův termostat generuje nesprávnou kinetickou energii, a izotropický tlak se standardně používá pro MD simulace molekul s rozpouštědlem, byly MD simulace peptidů ve vodě a MD simulace CTD kolicinů ve vodě spuštěny pod izotropickým škálováním. Použitá kompresibilita byla  $4.5e^{-5} \text{ bar}^{-1}$ . Konstanta pro barostat (tj. pro rozpínání a smršťování pbc boxu) byla nastavena na 10 ps.

Integrační krok pro výpočet simulací byl 2 fs. Celková délka MD simulací peptidů (a CTD kolicinu A a U) ve vodě byla 200 ns. Pro MD simulace peptidů v membráně to bylo 500 ns, pokud není uvedeno výslovně jinak. Vypočítané nové souřadnice pro trajektorii se ukládaly každých 20 ps, ale pouze každých 60 ps trajektorie bylo použito k analýzám. Před spuštěním MD simulace peptidu v membráně byla vždy provedena ekvilibrace o celkové délce 100 ps s použitím definice *posre.itp*.

#### 4.1.7 Složení systému a jeho příprava pro simulaci

Systém pro **simulaci peptidu ve vodě** se skládal z cca 11500 molekul vody, proiontů a 1 peptidu. Postup přípravy rozpuštěného peptidu ve vodě je uveden v Přílohách.

System pro **simulaci peptidu v membráně POPC ve vertikální (Obr. 21A), středově horizontální (Obr. 21B) a horizontální pozici pod polárními hlavičkami (Obr. 21C)** se skládal ze 128 molekul POPC, cca 5000 molekul vody, protiiontů a 1 peptidu. Postup přípravy peptidů v membránách je uveden v kapitole výsledků, neboť nalezení vhodného postupu bylo jedním z cílů této závěrečné práce. Tento vynalezený postup přípravy je opět podrobně rozepsán v Přílohách.



**Obr. 21:** Pozice peptidu v POPC membráně při startu MD simulace: A) vertikální orientace, B) středově horizontální orientace, C) horizontální orientace pod POPC hlavičkami. Zobrazeno pomocí VMD. Barevné značení: peptid (tmavě červeně), MK POPC membrán (tyrkysově), atomy N molekul POPC (modře), atomy P molekul POPC (zlatě), molekuly vody (červeně).

System pro **MD simulaci H1 v modelové membráně *E.coli*** obsahoval 1 molekulu H1 kolicinu U, 100 molekul POPE, 28 molekul POPG, 5592 molekul vody, 28 monovalentních kationů  $\text{Na}^+$  a 28 monovalentních aniontů  $\text{Cl}^-$  odpovídající 154mM koncentraci soli. Dále obsahoval ještě dalších 28 protiiontů  $\text{Na}^+$  k záporně nabitým 28 POPG a další 3 protiionty  $\text{Na}^+$  k záporně nabitému H1. Celková koncentrace iontů  $\text{Na}^+$  byla (310mM). Velikost boxu pro simulaci H1 v připravené membráně POPE:POPG byla 6 x 6 x 9 nm.

System pro simulaci peptidů z CTD kolicinu U **H1-H2 (R-4), H2-H3 (R-4), H8-H9 (R-1), H9-H10 (M-1), H8-H9-H10 (M-1), H1-H2-H3-H4, H4-H5-H6-H7, H7-H8-H9-H10, (H1, H3, H5, H10), 6x H1 (M-1)** v membráně POPC se skládal ze 128 molekul POPC, dlouhého peptidu, ev. čtyř krátkých peptidů, ev. šesti peptidů H1, protiiontů a cca 5115 molekul vod. Velikost pbc boxu na počátku všech těchto MD simulací byla přibližně 7 x 7 x 7.2 nm.

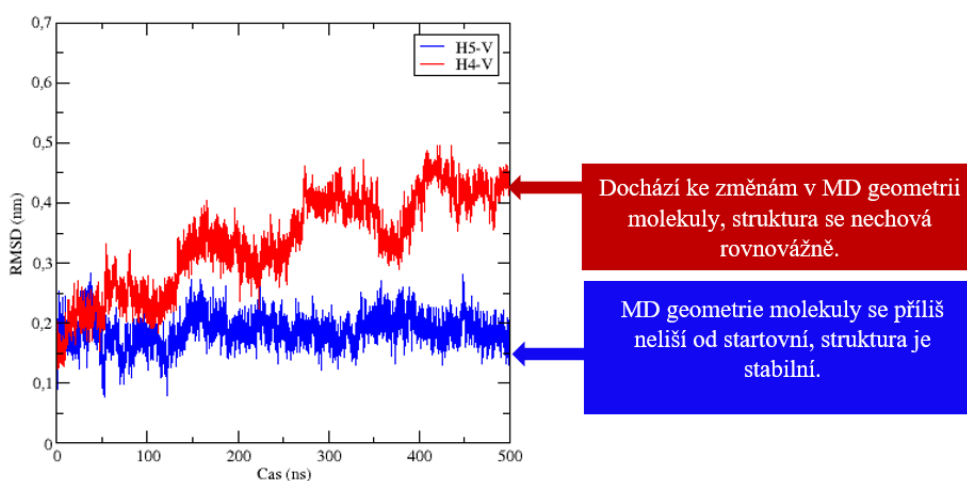
System pro **simulaci CTD kolicinu U a A ve vodě** byl složen z cca 95000 molekul vody, protiiontů a zvolené sekvence CTD kolicinu.

### 4.1.8 Analýzy trajektorií

V MD simulacích byla používána analýza RMSD, helicity, sklonu peptidu v membráně, hustotního profilu jednotlivých atomů v membráně a sekundární struktury peptidu v průběhu MD simulace. Tyto základní analýzy jsou stroze představeny v následujících oddílech této kapitoly.

#### 4.1.8.1 RMSD ~ Odchylna od experimentální struktury

Analýza střední kvadratické odchylny (RMSD, **R**oot **M**ean **S**quare **D**eviation“) informuje o tom, jak je peptid v průběhu MD simulace stabilní a jak moc se blíží experimentální struktuře. Ukázka RMSD analýzy je na Obr. 22.



**Obr. 22:** Příklad analýzy RMSD. Zobrazena je RMSD pro  $\text{C}\alpha$  helixu H4 a H5 kolicinu U při vertikálním vložení do POPC membrány. Helix H4 (červeně) v POPC membráně se v průběhu MD simulace rozvolňoval. Zřejmě nepreferuje hydrofobní prostředí, orientaci, nebo mu chyběl interakční partner. Helix H5 (modře) byl naopak v POPC membráně stabilně helikální, prostředí lipidové membrány pravděpodobně preferuje.

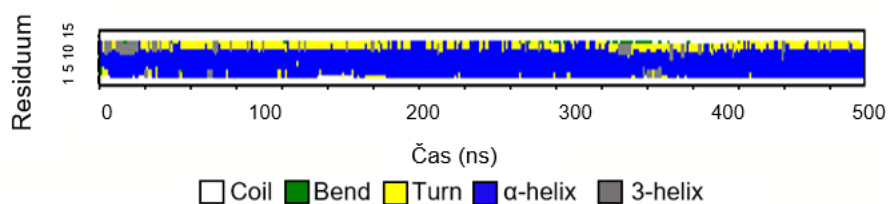
Analýza RMSD vypočítá časový vývoj vzdáleností mezi atomy dané struktury vůči struktuře referenční (v čase  $t_2 = 0$ ), tj. poskytnuté experimentální metodou. V rovnici pro RMSD (4.20) představuje  $M = \sum_{i=1}^N m_i$  a  $r_i(t)$  pozic atomu  $i$  v čase  $t$ . Rovnice (4.20) byla převzata z <http://manual.gromacs.org> (k 6.8.2017).

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[ \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (4.20)$$

V Gromacsu lze tuto analýzu spočítat příkazem `g_rms -f traj.xtc`. Uživatel je vždy vyzván ke zvolení skupiny atomů, pro které se má RMSD vypočítat. Ve své práci jsem RMSD počítala pouze pro atomy Ca peptidů.

#### 4.1.8.2 Sekundární struktura

Analýza sekundární struktury proteinů poskytuje také informace o stabilitě dané struktury. Je normální, že koncová residua peptidu strukturně fluktuují kolem dobře definovaného stabilního stavu (Obr. 23). V dlouhých MD simulacích proteinového skládání by tato analýza ukázala, jak a jaké sekundární struktury se ve skládání uplatňují. Tuto analýzu lze vypočítat v každém snímku trajektorie programem DSSP (Kabsch a Sanders 1983) příkazem např. `do_dssp -s topol.tpr -f run.xtc`. Výstupem je formát xpm, který lze v Gromacsu převést programem `xpm2ps` na formát postscript. Příkaz používaný k tomuto účelu je např. `xpm2ps -f ss.xpm -o Sekundarni_Struktura_H5.eps`.

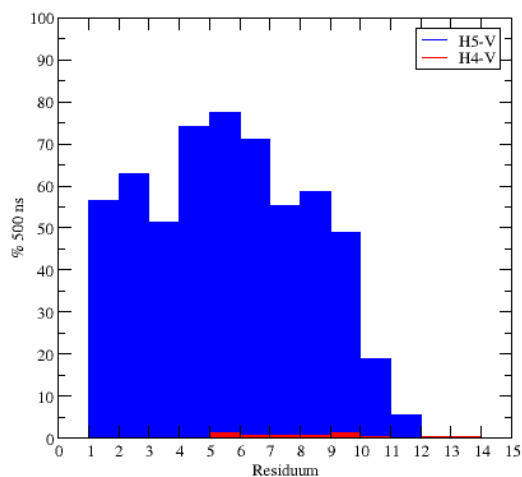


**Obr. 23:** Příklad analýzy sekundární struktury helixu H5 kolicinu U vloženého do membrány POPC ve vertikální orientaci.

#### 4.1.8.3 Helicita na residuum

Tato analýza informuje o helicitě daného residua v % MD času trajektorie (Obr. 24). V Gromacsu ji lze vypočítat nástrojem `g_helix`. V analýze se nejprve kontroluje zadaná struktura peptidu. Pomocí této kontroly se stanoví nejdelší helikální oblast určená vodíkovými vazbami a  $\varphi/\psi$  úhly. Tato část je pak fitována vůči ideálnímu helixu kolem osy z s centrem v počátku. Kromě analýzy helicity vypočítané příkazem `g_helix -f traj.xtc -q -n index.ndx` se obvykle současně vypočítají i další vlastnosti helikální struktury. Ty jsou např.: poloměr helixu, „twist“ (průměrný úhel helixu na residuum), stoupání na residuum, celková délka helixu v nm, helikální dipól, RMSD

odchylka od ideálního helixu pro  $\text{C}\alpha$ , průměrný dihedralní úhel  $\text{C}\alpha$ -  $\text{C}\alpha$ , průměrný  $\varphi$  a  $\psi$  úhel, elipticita v 222 nm podle Hirsta a Brookse (manuál Gromacsu 5.1.4).

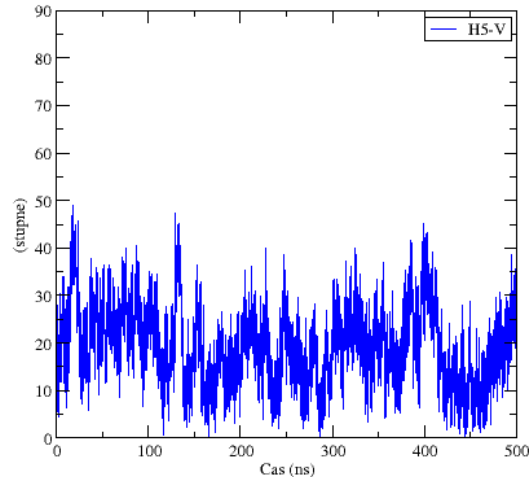


**Obr. 24:** Příklad analýzy helicity na residuum pro helix H4 (červeně) a H5 (modře) kolicinu U vložený na počátku MD simulace do membrány ve vertikální orientaci. H5 je v průběhu MD simulace vysoce helikální. Její C-koncová část helicitu postupně ztrácí, ale sekvence u N-konce je minimálně v 50 % stále helikální. Je tedy možné, že zvolená sekvence k MD simulaci je možná nekompletní a délka helixu H5 v membráně je ve skutečnosti delší než v solubilním stavu. Helix H4 v MD simulaci okamžitě ztratil svou helicitu.

#### 4.1.8.4 Sklon peptidu v membráně.

Analýzu sklonu peptidu v membráně jsem v této práci počítala nástrojem *g\_bundle*, který analyzuje osy šroubovic. K tomuto výpočtu je třeba definovat v indexovém souboru atomy, kterými by měla být tato osa proložena. Výstupem nástroje *g\_bundle* je délka této osy, její vzdálenost a posunutí vzhledem k průměrné ose, celkový náklon, radiální náklon a laterální náklon vzhledem k průměrné ose. Já jsem v této práci použila jako referenční osu osu z.

Příkaz, který jsem zadala byl: `g_bundle -f traj.xtc -s topol.tpr -n index.ndx -e 500000 -dt 60 -na 1 -z`. Ukázkový záznam z takto vygenerované analýzy je na Obr. 25.



**Obr. 25:** Příklad analýzy sklonu H5 v membráně POPC. Jelikož bylo chování H5 v membráně rovnovážné, lze zvolit ke studiu celý interval 500 ns. 0 ° odpovídá vertikální orientaci H5 v POPC membráně. Ze záznamu je zřejmé, že se H5 v POPC vyskytovala průměrně pod náklonem cca 23°. Horizontální orientaci (90 °) v membráně si H5 v celém časovém intervalu 500 ns ani jednou nezvolila.

#### 4.1.8.5 Hustotní profil zvolených atomů v systému

Další hojně používanou analýzou, obzvláště pro membránové proteiny, patří vypočítání hustoty různých skupin atomů v lipidové membráně. Pro malé systémy o pevné velikosti boxu lze hustotní profil snadno interpretovat. Pro větší systémy to však může být s interpretací složitější, neboť proteiny mají nízkou objemovou stlačitelnost a lipidy naopak poměrně vysokou. Praktickým důsledkem je, že tloušťka membrány může kolísat i u jinak relaxovaného systému. Nástroj *g\_density* v sobě zahrnuje možnosti, jak tento vliv zmírnit. Je však na uživateli, zda toho využije. Velké lipidové membrány, pak vykazují vlnité pohyby (manuál Gromacsu 5.1.4).

Další podrobnosti o tom, jak která analýza operuje se zadanými příkazy, a to, na jakém teoretickém principu jsou výsledky vyhodnoceny, si vážený čtenář může přečíst v manuálu Gromacsu, např. na <http://manual.gromacs.org/documentation/5.1.4/manual-5.1.4.pdf>.

## 4.2 Chemická syntéza krátkých peptidů na pevné fázi

Jedním z původních cílů této práce bylo experimentální ověření chování jednotlivých helixů CTD kolicinu U z MD simulací. Nakonec jsme se však rozhodli ověřit pouze chování H1 kolicinu U, který se v MD simulaci projevoval pórotvorně alespoň u příbuzného kolicinu A a Ia. Pórotvornost peptidu lze pozorovat pomocí metody BLM. Nejdříve bylo však třeba protein H1 syntetizovat.

Existuje mnoho různých metod, jak připravit protein – izolovat ho z přírodních materiálů, vyrobit přes genové inženýrství, nebo ho chemicky syntetizovat. Volba vhodné metody jeho syntézy závisí především na délce jeho AMK řetězce.

Chemická syntéza se běžně používá k výrobě peptidů o délce až 50 AMK. Chemicky připravené peptidy však nemají definovanou sekundární a terciární strukturu. Peptidy se chemickou syntézou vyráběly v minulém století pouze v roztoku - ručně, např. v injekční stříkačce. To lze provést i dnes, ale tento způsob přípravy je časově náročný. Naprostý přelom nastal po publikaci práce Bruce Merrifielda, který za ni obdržel roku 1984 Nobelovu cenu. Formuloval v ní postup syntézy peptidů na pevné fázi, který spočíval v připojení jeho první AMK jejím C-koncem na lineární nosič – polymer (Merrifield 1986). Její výhoda spočívala právě v rychlosti a možnosti automatizace, neboť stroj dokáže spojit 30 AMK i více za jeden den.

Základem této metody je polymer, na který je připojen karboxyl první AMK. K této navázané první AMK lze potom přidat další AMK (s chráněnou reaktivní skupinou), čímž dojde k tvorbě peptidové vazby. Postupným přidáváním AMK je postupně prodlužován peptidový řetězec. Dochází k reakci karboxylové skupiny AMK s aminoskupinou AMK, která je připojená přes linker na pevnou fázi, tzv. nosič, „solid phase“ (Merrifield 1986).

Další výhodou této metody je, že jelikož je rostoucí peptidový řetězec navázaný na makromolekulu (např. kuličku polystyrenu), všechny čistící operace během syntézy, ke kterým musí docházet kvůli přidávání přebytku reaktantů, mohou probíhat formou filtrace. Po promytí se může pokračovat v syntéze peptidu dále. Při normální chemické reakci musejí být reaktanty také odděleny, ale to už bývá obvykle složitější. Přebytek AMK je nutné přidávat proto, aby došlo ke zreagování na více než 99 %. I když je 99% účinnost velmi efektivní, při výrobě peptidu vždy vznikají zároveň i nečistoty, nebo peptidy s chybějící AMK v sekvenci. Deleční peptidy jsou problematické z toho důvodu, že jsou většinou neoddělitelné. Míru této účinnosti si lze představit např. na syntéze 10AMK peptidu, pokud by jeho syntéza probíhala pouze s 90% účinností, tak



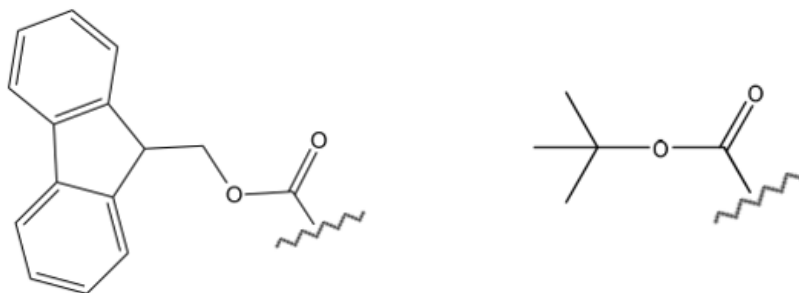
$0,90^{10}$  je pouze 35 %. Když by se mělo jednat o syntézu 20AMK peptidu, tak  $0,90^{20}$  činí pouze 12 %. Z toho je již patrné, že 99% a vyšší úspěšnost propojení dvou AMK je klíčovou vlastností. Toto je také ale zároveň důvod, proč je tato syntéza omezena pouze na krátké peptidy.

#### 4.2.1 Použití chránících skupin Fmoc a *t*-Boc v syntéze a coupling

Samotná syntéza peptidu probíhá v automatickém syntetizátoru opakováním dvou dějů: 1. kondenzací chráněné AMK na AMK rostoucího peptidu a 2. odstranění chránící skupiny po ukončení kondenzace. Syntéza probíhá ve směru od C-konce k N-konci budoucího peptidu. Postupným přidáváním AMK v nadbytku do syntetizátoru a sekvenčně za sebou tak, aby AMK odpovídaly požadované sekvenci, se získá chemicky syntetizovaný výsledný peptid.

Amidová vazba se tvoří nukleofilním atakem aminu na karboxylovou skupinu. Proto musí být prvním krokem syntézy peptidu na pevné fázi aktivace karboxylové skupiny (Albericio, et al. 2001). C-koncová AMK budoucího peptidu je ve většině syntéz připojena přes linker na pevnou fázi a není nutné tuto skupinu tedy chránit. To zajišťuje právě linker. Naopak  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> skupinu je třeba chránit, zastavit její reaktivitu, neboť by mohlo docházet skrze ni k další polymerizaci peptidu. Tuto dočasně chránící skupinu je potom třeba několikrát během syntézy odstranit, nicméně nesmí zároveň dojít k odstranění i dalších chránících skupin na postranních řetězcích AMK, které jsou obvykle odstraňovány až při finálním odštěpení peptidu z pevné fáze.

Často používanou chránící skupinou pro -NH<sub>2</sub> skupinu AMK je Fmoc (9-fluorenylmethoxykarbonyl) a *t*-Boc (terc-butyloxykarbonyl). Obě skupiny jsou znázorněny na Obr. 26.



**Obr. 26:** Dvě nejznámější chránící skupiny v chemické syntéze na pevné fázi – Fmoc (vlevo) a *t*-Boc (vpravo). Struktury byly nakresleny za použití programu ChemSketch verze 11. dostupné na <https://chemsketch.en.softonic.com/> (k 6.8.2017).

F-moc skupina používána ke chránění  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> skupiny AMK je při přidávání kyselin stabilní. Odštěpována je bazicky. Důvodem je, že snadno poskytuje vodík konjugované kyselině, čímž z Fmoc vzniká anion stabilizovaný aromatickými kruhy. Je tedy náchylná k sekundárním aminům, a proto je odstraňována 20% piperidinem v DMF.

*t*-Boc skupina je naopak stabilní při přidávání bází a nukleofilních činidel. Odštěpována je v kyselém prostředí, neboť z *tert*-butylu vzniká snadno kation. Proto také patří mezi *tert*-butylový typ chránících skupin. Tento typ skupin se používá např. u tyrosinu, threoninu, serinu. Konkrétně se u těchto AMK jedná o *tert*-butyl étery, u kyseliny asparagové a glutamové se používají estery. U lysinu se uplatňuje právě *t*-Boc. Po přidání trifluoroctové kyseliny (TFA) do reakční směsi se syntetizovaným peptidem dochází k odštěpení *t*-Boc z -NH<sub>2</sub> skupiny postranních řetězců AMK. Pro speciální AMK typu tryptofanu, histidinu, aj. se používají specifické skupiny s různou strukturou. Na jejich struktuře totiž nezáleží. Závisí pouze na podmínkách, při kterých jsou tyto chránící skupiny schopné se odštěpit (Fields a Noble 1990, Chan a White 2000).

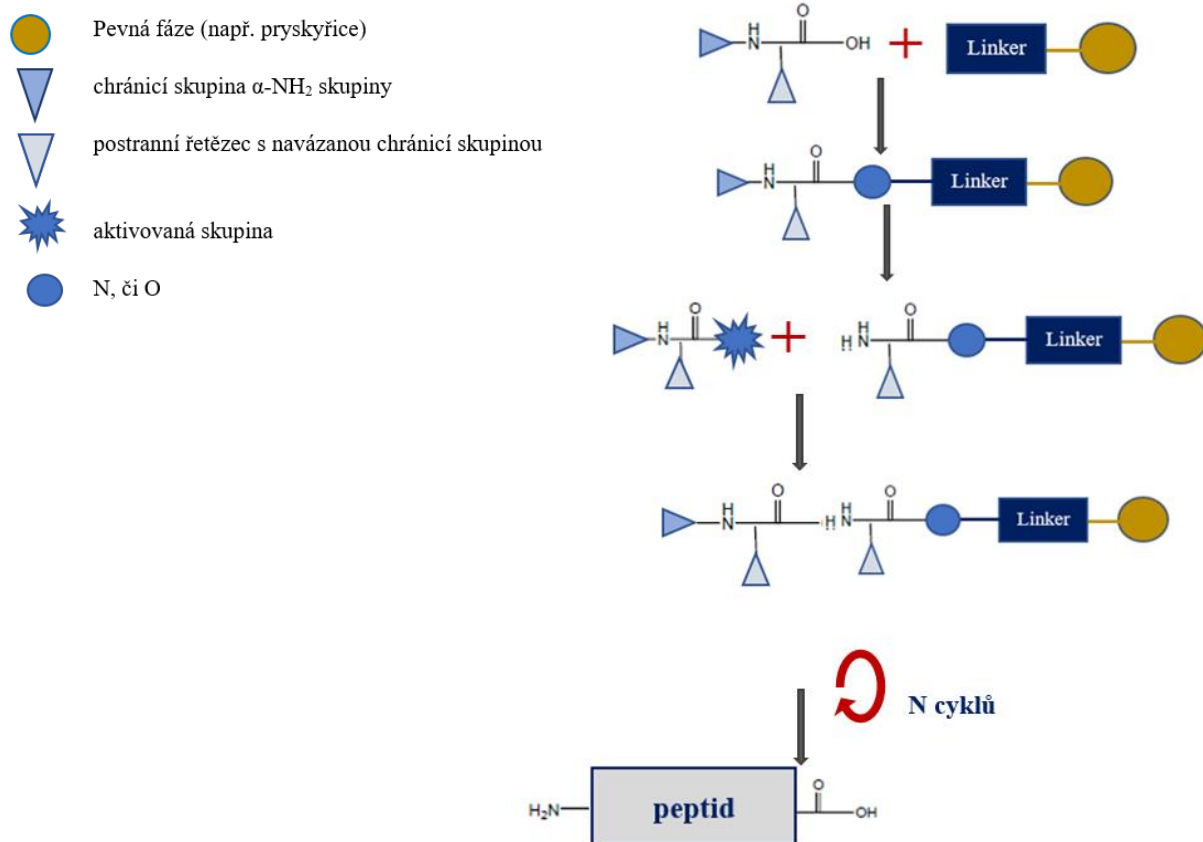
Pro lepší pochopení a praktickou představu uvedu příklad na použití lysinu a kyseliny asparagové v syntéze. Lysin má dvě NH<sub>2</sub> skupiny a do reakční směsi je přidáván jako lysin s navázanými chránícími skupinami na jeho NH<sub>2</sub>-skupinách. V syntéze je třeba, aby reagovala  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-skupina AMK, tedy ne aminoskupina postranního řetězce. Z toho důvodu je žádoucí použití dvou typů chránících skupin lišících se v podmínkách, při kterých se odštěpují. Po přidání piperidinu, báze, dojde k odstranění chránící skupiny právě na  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> skupině AMK. Toto zajistí, že syntéza může probíhat dál a rostoucí peptid se nebude zároveň prodlužovat i na postranním řetězci lysinu.

Aby se mohla Fmoc-kyselina asparagová zařadit do rostoucího peptidového řetězce, musí mít  $\alpha$ -karboxyl volný, protože skrze něj je třeba vytvořit peptidovou vazbu. Nechráněný karboxyl na postranním řetězci rostoucího peptidu není žádoucí. K tomuto účelu se používá *tert*-butylester, který má obdobné vlastnosti jako *t*-Boc – je relativně stabilní v bazických podmínkách a je štěpitelný kyselé.

#### 4.2.2 Odštěpení peptidu z pevné fáze a „scavengery“

Pro dokončení syntézy peptidu o požadované sekvenci ho je třeba oddělit od pryskyřice a odstranit chránící skupiny bočních řetězců AMK, které na nich jsou stále navázány (Obr. 27). Pro peptidovou syntézu používající Fmoc/*t*-Boc, ho lze odštěpit společně spolu s chránícími skupinami

v postranních řetězcích pomocí trifluoroctové kyseliny (TFA). TFA je silná nízkovroucí kyselina, která se dá snadno odpařit a není tak agresivní v plynné fázi, jako je chlorovodík. Nicméně např. *t*-Boc skupina při reakci s touto kyselinou, tvoří *tert*-butylový kation, který je vysoce reaktivní a může napadat aromatické postranní řetězce tyrosinu a tryptofanu, alkylovat cystein, aj. Z tohoto důvodu se přidávají „vychytávače“ („zametače“, „scavengers“), které produkty degradace chránících skupin, *tert*-butylové kationy, obvykle vychytají. K tomuto účelu se používají merkaptany a thioanisoly. Např. triizopropylsilan je látka se třemi alkylskupinami, která je stabilní vůči tvrdé TFA. Pokud je v blízkém okolí tvrdé kyseliny *tert*-butyl, je na něj snadno přenesen elektron z křemíku triizopropylsilanu. Tím vzniká kation křemíku, který se naváže na vodu a zároveň se vytvoří volně unikající izobutan místo izobutylenu, který by se normálně vytvářel. Z celé chránící skupiny *t*-Boc tedy zbyde jen izobutan a CO<sub>2</sub>. Ty se oba odpaří. Celkové schéma přípravy je na Obr. 27.



**Obr. 27:** Syntéza peptidu na pevné fázi. AMK s chráněnou aminoskupinou a chráněným postranním řetězcem je nejprve navázána na nosič, např. pryskyřici. Toho lze docílit aktivací karboxylové skupiny pomocí aktivátoru. Pak následuje odstranění chránící skupiny  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> skupiny

AMK. Přidáním další aktivované AMK dojde k propojení těchto dvou AMK. Celý cyklus přidávání dalších AMK a odstraňování jejich chránících skupin se poté může opakovat. Nakonec se odstraní chránící skupiny postranních řetězců peptidu a peptid se odštěpí od pryskyřice. Tvorba obrázku byla inspirována schématem v publikaci Amblard et al. 2006.

### 4.2.3 Vysrážení peptidu a jeho následná purifikace a analýza

Po dokončení syntézy peptidu, jeho oddělení od pevné fáze, odstranění všech chránících skupin a přidání scavengerů, je nutné nechat peptid vysrážet a odpařit štěpící roztoky. Štěpící roztoky se odpaří snadno, neboť z *t*-Boc vznikne izobutan a CO<sub>2</sub>, jak je popsáno výše. K vysrážení peptidu je ještě třeba použít organického rozpouštědla, éteru, čímž dojde k samotnému vysrážení a zároveň také k omytí peptidu od zbytků a scavengerů. Výsledkem pak je bílá sraženina představující nerozpustný surový peptid.

Následně je třeba provést purifikaci tohoto surového peptidu. K tomuto účelu se obvykle používá např. RP-HPLC, což je kapalinová chromatografie s reverzní fází. Reverzní v tom smyslu, že jde o obrácené fáze, než bylo v původním uspořádání. Stacionární fází zde tvoří hydrofobizovaný silikagel tvořený řetězcí C18. Používanou mobilní fází je acetonitril v pufru. Většinou se přidává ještě menší množství trifluoroctové kyseliny. Hydrofobní peptidy jsou zachyceny v koloně a hydrofilní procházejí rychle. K postupnému uvolnění i hydrofobních peptidů je třeba zvyšovat gradient přidávaného acetonitrilu. Může se postupovat v přidavku acetonitrilu až ke 100 %. Postupně se tedy z kolony uvolní vše.

Aparatura obsahuje absorpční UV-detektor, jehož záznamem je pak chromatogram odpovídající složení procházejícího surového peptidu. Po zhodnocení kvality syntézy z první analýzy je třeba zvolit optimální gradient na preparaci, vyměnit malou kolonu za velkou, rozpustit vhodné množství surového peptidu a nastříknout ho do kolony. Poté dochází k postupnému výstupu jednotlivých frakcí z kolony, které je třeba jímat. V téměř konečné fázi je třeba ověřit složení preparovaného peptidu. K analýze přesného složení hypoteticky preparovaného peptidu se používá např. TOF-MS ESI (Time of flight hmotnostní spektrometrie, ESI je elektrosprej k ionizaci). Ta určí molekulovou hmotnost jednotlivých látek na základě průchodu nabitých iontů, které při dopadu na detektor vytvářejí elektrický proud, kterým je zaznamenán dopad konkrétních iontů v určitém čase. Poté je třeba zjistit, o jaké ionty jde. Ionty se rozlišují podle poměru jejich hmotnosti a náboje (*m/z*), tzn. že v analyzátoru ionty driftují tím pomaleji, čím je vyšší jejich molekulová

hmotnost. Při vyhodnocení výsledků z TOF-MS ESI je potřeba vzít v úvahu, že v případě použití elektrospreje často nemá ion pouze jeden náboj a mohou se tvořit adukty s vodíkem. To je způsobeno tím, že v mobilní fázi je kyselina. Pokud složení preparovaného peptidu odpovídá složení požadované sekvence, pak ho lze nechat lyofilizovat. Tím je peptid hotov a připraven k experimentálnímu studiu.

#### **4.2.4 Alternativní způsob přípravy peptidu**

Peptid lze připravit i v roztoku ručně. Metoda jeho přípravy je analogická výše uvedenému postupu, jen se místo automatického syntetizátoru používá injekční stříkačky. Časově je tento přístup náročnější a je vhodný spíše pro krátké peptidy. V mém případě byl pro přípravu peptidu H1 o 28 AMK zvolen automatický syntetizátor. Doba syntézy H1 trvala cca 30 hodin.

#### **4.2.5 Použité přístroje a materiál**

K syntéze peptidu H1 byl použit PS3 automatický syntetizátor. Použitá HPLC kolona byla YMC-PC-ODS-AM (AM12S05) 250x20 mm, průměr 5  $\mu\text{m}$  (12 nm póry). Všechny chemikálie – AMK s navázanými chránícími skupinami, i přístroje pro syntézu a preparaci H1 mi byly poskytnuty skupinou Dr. Pavla Majera UOCHB AV ČR.

#### **4.2.6 Postup chemické syntézy peptidu H1 kolicinu U a analýza**

Nejprve byla připravena pevná fáze (pryskyřice), použito jí bylo 100 mg. Poté byly navázeny jednotlivé AMK tvořící sekvenci peptidu H1 kolicinu U, tak aby byly v nadbytku. Každá navážená AMK s chráněnými skupinami byla vložena do cartridge spolu s TBTU. Jednotlivé cartridge byly potom srovnány v sekvenci H1 peptidu od jeho C- konce k N-konci a vloženy do syntetizátoru. Přístroj automaticky odebral první cartridge a začal provádět syntézu. Do cartridge byl automaticky vložen dimethylformamid s bází DIEA. Tím se aktivovala AMK a mohlo dojít k reakci s pryskyřicí. Pak následovalo odchránění  $\alpha\text{-NH}_2$  skupiny a dlouhé promývání. Po dokončené syntéze byl peptid H1 o 28 AMK odštěpen z pevné fáze přidáním roztoku kyseliny TFA. A také byly odstraněny chránící skupiny a odfiltrovány scavengery.

Následně bylo třeba analyzovat hmotu z automatického syntetizátoru pomocí RC-HPLC. K nastříknutí hmoty obsahující peptid H1 do kolony HPLC jej bylo třeba nejdříve rozpustit. 3x 0,01 g hmoty se nepodařilo rozpustit ani v 2% acetonitrilu v 0,1% TFA, ani v destilované vodě

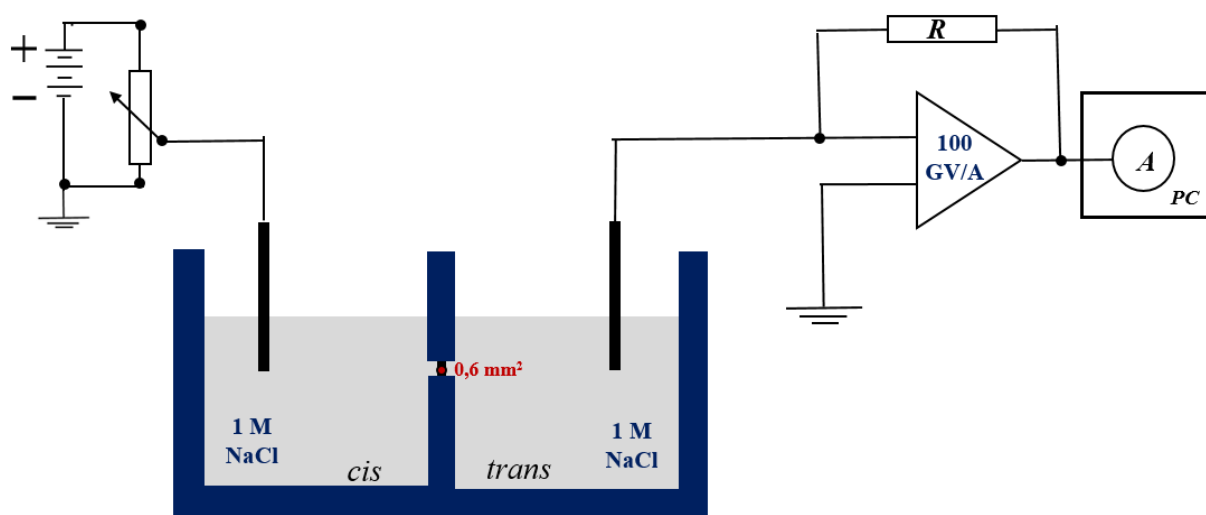
s 2% acetonitrilem. K jeho rozpuštění byla nakonec použita čistá 0,1% TFA a cca 20 minut v ultrazvuku. Po jeho přefiltrování byla hmota s H1 peptidem analyzována na RC-HPLC spojené s hmotnostním spektrometrem. Sledovány byly retenční časy procházejících frakcí. Na základě údajů z hmotnostní spektrometrie byla následně identifikována hmota frakcí vycházející z kolony HPLC. Poté byla vyměněna analytická kolona za preparační a byl zvolen vhodný gradient acetonitrilu pro vymývání kolony. Čistota preparovaného peptidu H1 byla potom znovu ověřena pomocí hmotností spektrometrie. Grafické záznamy jsou uvedeny v kapitole výsledků. Preparovaný peptid byl nakonec lyofilizován.

### 4.3 Měření na BLM

Po úspěšné syntéze peptidu H1 jej bylo možné použít k experimentálnímu studiu. Jeho případnou pórotvornou aktivitu by šlo detekovat pomocí metody měření na BLM. Z tohoto důvodu jsem tuto metodu využila ve své práci.

Tyto modelové planární membrány se používají pro charakterizaci elektrických vlastností kanálů, kterými mohou molekuly a ionty procházet napříč. Existuje více metod jejich přípravy, které se obvykle označují podle jmen svých vynálezců. V této práci byla využita upravená Muellerova metoda (tzv. „painting“ metoda).

Zjednodušené schéma aparatury pro BLM měření, na které jsem pracovala, je zobrazeno v Obr. 28. Aparatura se skládá z teflonové komůrky rozdělené přepážkou s otvorem na dvě části. Obě komůrky jsou naplněny roztokem obsahujícím sůl a na otvor přepážky se nanáší fosfolipidy. Tím se vytvoří izolace mezi oběma komůrkami. Do komůrek se vloží elektrody. V této práci byly použity postříbřené drátky s vyloučeným chloridem stříbrným na jejich povrchu (tzn. Ag/AgCl elektrody).



**Obr. 28:** Zjednodušené schéma aparatury BLM. V levé části obrázku je zdroj napětí (tři AA baterie). Na membránu bylo vkládáno napětí 50 mV. Vytvořená lipidová membrána (BLM) v přepážce funguje jako izolant, který odděluje dva roztoky elektrolytu NaCl. Pokud je k membráně přidán takový protein, který je v ní schopný vytvořit kanál, pak obvodem prochází elektrický proud. Tento proud lze zesílit zesilovačem a zaznamenat A/D převodníkem.

Spínačem aparatury se na modelovou lipidovou membránu, která funguje jako izolant, skrze elektrodu přenáší vnější napětí. Protein (ev. peptid) se obvykle přidává do roztoku elektrolytu na cis stranu teflonové komůrky. V případě, že dojde v průběhu měření k vytvoření membránového kanálu, začne skrze modelovou membránou protékat elektrický proud v řádu pA. Tento proud lze zesílit pomocí zesilovače. V této práci byl použit zesilovač LCA-200-100G, který zesiloval  $10^{11}$  krát. To znamená, že při vstupu 1pA došlo na výstupu k záznamu 0,1 V pomocí 12-bitového A/D převodníku (KPCI-3102). Sběrání dat probíhalo při vzorkovacím kmitočtu 1 kHz pomocí programu BLM2 (Jiří Bok, MFF UK). Celá aparatura je obklopena Faradayovou klecí, aby bylo zajištěno, že uvnitř nebude působit vnější elektrické pole.

#### 4.3.1 Postup pro měření pórotvorných vlastností H1 kolicinu U

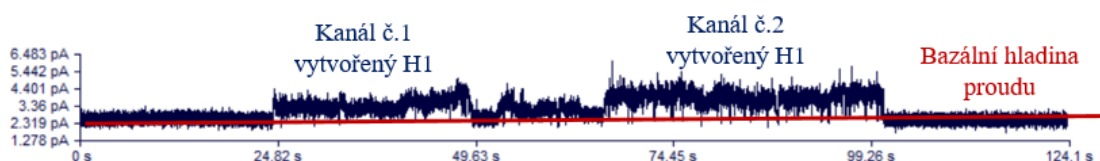
Obě teflonové komůrky obsahovaly 1 ml roztoku 1M NaCl, 10mM HEPES o pH 7. Jako nanášené lipidy na otvor přepážky byl použit 3% azolektin rozpuštěný ve směsi n-dekanu a

butanolu v poměru 9:1. H1 kolicinu U byl rozpuštěn ve 40 ul destilované vody. Jeho koncentrace v měřeném roztoku pak byla 0,069 mM, 0,138 mM, 0,276 mM, 0,552 mM.

Před každým měřením musela být teflonová komůrka vždy důkladně omyta. H1 měl silnou tendenci ulpívat na povrchu komůrky i při opakovaném použití rozpouštědel (5x denaturovaný etanol, voda, etanol a 1x pentan). K jeho degradaci zaručeně došlo při deseti-minutovém omývání celé komůrky proudem vařící vody.

### 4.3.2 Analýza pórtvorných vlastností

Data byly analyzována programem QuB a filtrována při 50 Hz v záznamu 6000 kroků na stopu. Proud protékající membránou bez přidaného peptidu H1 byl považován za bazální hladinu (Obr. 29). Pravoúhlé skokové zvýšení proudu po přidání peptidu H1 na cis stranu bylo považováno za projev tvorby póru. Měření probíhalo při vkládaném napětí 50 mV (kladná hodnota na cis straně). Měřeno bylo množství a aktivita vznikajících pórů v membráně vzhledem k použité koncentraci H1 v roztoku. Každá koncentrace H1 v roztoku byla měřena 3x po dobu 30 minut na jednu membránu. Také jsem provedla měření pro tři lipidové membrány po 30 minutách bez přidaného H1. Většinou se v nich nevyskytovaly žádné poruchy. Pravoúhlé poruchy membrány, které jsem neviděla v kontrolním měření samotných membrán bez H1, jsem po přidání H1 k membráně obvykle považovala za projev jeho aktivity.



**Obr. 29:** Záznam pórtvorné aktivity H1 v lipidové membráně. Červená křivka představuje základní hladinu proudu. Pravoúhlé skokové zvýšení protékajícího proudu vůči této bazální hladině jsem považovala za otevřený pór. Obrázek byl vygenerován ze softwaru QuB. Na ose x je čas a na ose y hodnoty proudu.

Vodivost  $G$  [S] byla vypočítaná ze vzorce  $G = I/U$ , ve kterém  $I$  [A] představuje rozdíl naměřeného proudu procházejícího membránou a bazálního proudu,  $U$  [V] je napětí. Vstupní jednotky byly pA a mV, tudíž jsem výsledné nS násobila tisícem, tím jsem získala pS.



## 5 Výsledky

Cílem této práce bylo prozkoumat chování jednotlivých helixů CTD kolicinu U v lipidové membráně. K tomu účelu byla zvolena metoda molekulové dynamiky (MD). Aby však mohlo být nějaké chování těchto helixů v membráně pozorováno, bylo nejdříve třeba vymyslet nebo vybrat vhodný způsob, jak tyto helixy v Gromacsu do lipidové membrány vložit.

### 5.1 Vložení peptidu do lipidové membrány pro MD simulace

Bylo třeba najít takový postup, kterým se podaří vložit peptid, ev. peptidy do membrány co nejefektivněji, za co nejkratší čas a při dobré reprodukovatelnosti pokusu. Prakticky bylo vyzkoušeno několik možností, jak připravit peptid v membráně. Ze začátku studia byly k tomuto účelu v podstatě využívány pouze dva přístupy, které se jevily jako nejvhodnější a které jsou popsány níže. Pro simulace byl nakonec vybrán pouze druhý postup.

První přístup založený na přidání peptidu z boku k membráně a jeho následného vtlačení do membrány se příliš neosvědčil, i když je prakticky snadno proveditelný. Peptid se v tomto postupu vložil v programu VMD vedle membrány (v ose x nebo y) a pbc box se zvětšil v odpovídající ose tak, aby obsahoval membránu i peptid. Následně se simulace spustila při vyšším tlaku (např. při 10 bar) a nižší teplotě (např. při 10 K). Při aplikaci tohoto postupu ale docházelo v některých případech ke ztrátě (nebo zisku) helikální struktury u helixu citlivých na polární (nebo hydrofobní) prostředí i při použití souboru *posre.itp* pro fixaci vazeb těžkých atomů peptidu. Další nevýhodou tohoto postupu bylo, že pokud se membrána dostatečně nezmrazila, začaly do ní pronikat molekuly vody. Většina mnou zkoumaných umělých peptidů je amfipatická, tudíž měla voda ve většině případů po vtlačení peptidu do membrány silnou tendenci pronikat směrem za ním. Pokud byla však membrána naopak zmrazena příliš (10 K), hrozilo pak, že se do ní některé peptidy nepodaří vůbec vtlačit. V některých případech bylo proto nutné membránu rozmrazit a následně ručně přesunout proniklé molekuly vody z membrány. Vzhledem k tomu, že v takovýchto případech bylo obvykle třeba přesunout ještě jeden až dva lipidy do správné monovrstvy membrány, přestal být tento způsob přípravy atraktivní.

Velmi rychlý a efektivní je způsob, nebo spíše trik, na přípravu proteinu v membráně, který jsem v této práci nakonec používala, popsány níže. Jeho výhodou je, že se v průběhu přípravy nic nemaže a nepřidává (s výjimkou přidávání protiiontů), a ani nepřesunuje. A jedná se o velmi rychlý

způsob přípravy s dobrou reprodukovatelností. Vzhledem k tomu, že jsem potřebovala připravit větší množství systémů pro MD simulace, byl krátký čas přípravy nezbytným požadavkem.

Peptid se v tomto případě přidal ve VMD k membráně z boku (v rovině mastných řetězců) v dostatečné vzdálenosti, aby nedocházelo k překryvu VDW obalů jednotlivých atomů, v pozici a orientaci, která je pro peptid požadovaná v konečném stavu. Následně bylo třeba definovat nový pbc box, např. původní rozměry boxu pro membránu zvětšit v každé straně např. o 0,3 nebo 0,5 nm. Poté program buď zvládl systém minimalizovat s minimálně 1000 kroky, nebo se jeho výpočet zastavil. Pokud minimalizování systému není možné, bylo efektivní přesunout peptid rovnou do jiné pozice vedle membrány a vyzkoušet minimalizaci opětovně. Pokud se v tomto případě minimalizace již vypočítala, byla prakticky vysoká šance, že systém bude brzy připraven. V některých případech bylo ještě třeba přidat do systému protiionty pro nabitě peptidy. To lze udělat v předchozím kroku, nebo i později. Výsledkem minimalizace by měl být peptid vložený v membráně. Systém však nelze ihned spustit při teplotě 310 K, jelikož se v takovémto systému vyskytovaly částečné překryvy vazeb a atomů. Já jsem postupovala tak, že jsem membránu ochladila na teplotu 50 K (ev. až na 10 K) a použila standardní Parinello-Rahmanův (ev. Berendsenův) barostat a v-rescale (ev. Berendsenův) termostat. Simulace se při velmi nízké teplotě obvykle spustila. Poté jsem membránu postupně ohřívala přes teplotu 120 K, 220 K a 310 K. Při teplotě 50 K, 120 K a 220 K simulace vždy trvala pouze 20 ps, pro 310 K výpočet trval 80 ps. Delší čas nebyl žádoucí, protože hrozilo, že za peptidem do membrány opět pronikne voda. Snímek z 80 ps simulace při 310 K pak obvykle tvořil vstupní souřadnice pro start simulace peptidu v membráně. Následně totiž stačilo už jen v *topol.top* vypnout vynucenou fixaci vazeb C- $\alpha$  a ostatních těžkých atomů. Pokud došlo k možnosti, že se první MD simulaci peptidu v membráně nepodařilo spustit ani při teplotě 10 K, opětovně minimalizaci či Berendsenově termostatu a barostatu, bylo potřeba se vrátit na začátek postupu. Tzn. přidat peptid k membráně v jiné pozici. I tak byl ale postup přípravy velmi rychlý a prakticky zabral od 20 minut do 5 hodin. Předchozím postupem tato činnost vyžadovala několik dnů až týden.

Tento kompletní návod s grafickou přílohou a využitými příkazy uvedený v Příloze. se osvědčil i pro přípravu simulačních systémů obsahujících až 4 peptidy v membráně současně – buď jako samostatné čtyři peptidy současně vložené, nebo jako jeden velký peptid zahrnující v sobě sekvence odpovídající čtyřem helixům CTD. Také jím lze snadno připravit membránu obsahující 6 transmembránových helixů. V tomto případě byly jednotlivé peptidy H1 kolicinu U přidávány

do membrány postupně. Na každý přidávaný peptid byla spočítána 20ps MD simulace při teplotě 50 K s definicí *posre.itp*. Při přidání 6. peptidu se pak opakovala sekvence postupného ohřívání membrány.

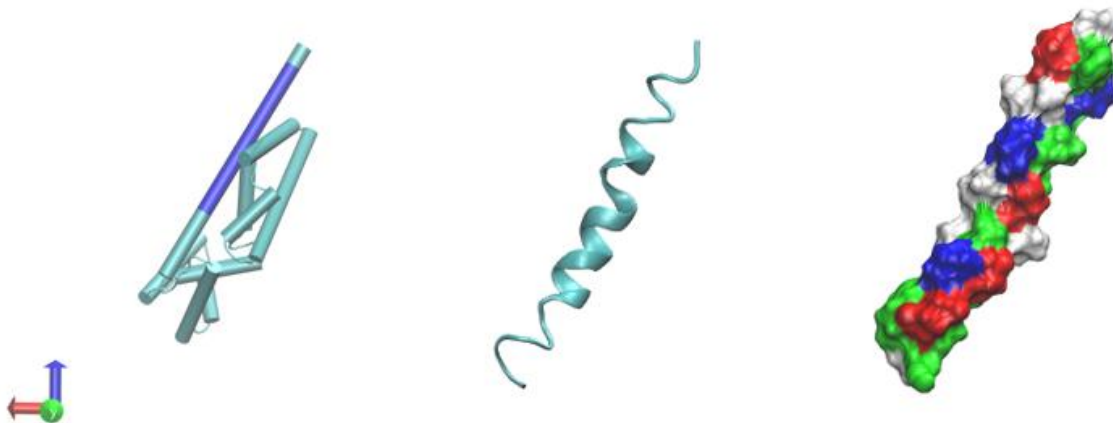
Při tvorbě systému - membrány s inkorporovaným peptidem - bylo dále uvažováno ještě vývojové prostředí “Membrane builder” (buď přímo ve VMD, nebo přes webové rozhraní). A také byl vyzkoušen postup, kdy se peptid přikládá k membráně v ose z, nebo se přidával do větší membrány. Žádný z těchto postupů se ale neosvědčil pro velmi rychlou přípravu systémů peptidu v membráně. Např. při vsouvání peptidu ze spodní strany membrány a v kladném směru osy z docházelo s některými peptidy i k přesunutí POPC lipidů z jedné monovrstvy membrány do druhé a následnému ukončení MD simulace. Přetažené lipidy bylo proto nutné „*pullingem*“ (do souboru *grompp.mdp* jsem vepsala instrukce pro sílu, která měla působit na daný atom dané molekuly v daném směru, např. atom P z POPC) vrátit zpět do jejich původní monovrstvy membrány. Z hlediska času tento postup tedy také nebyl vyhovující. Vložení peptidu do větší membrány a následovné smazání všech lipidů a molekul vody v určité oblasti od peptidu ve VMD se mi také neosvědčilo. Spuštění simulace velké membrány s peptidem při vhodných podmínkách a konečné smazání přebytečných molekul POPC a vody na požadované množství vyžadovalo totiž také příliš velké množství času pro přípravu. Což nebylo žádoucí vzhledem k plánovanému počtu simulaci.

## 5.2 Chování helixu H1 CTD kolicinu U v MD simulacích

Hlavním cílem této práce bylo prozkoumat chování všech helixů CTD kolicinu U v membráně POPC. Podrobně zde jsou však rozepsány jen výsledky pro helix H1. Chování ostatních helixů CTD kolicinu U v membráně POPC a ve vodě je dále uvedeno už jen stručnou tabulkovou formou. Nicméně pro všechny helixy existují obdobné analýzy jejich chování, jaké jsou demonstrovány právě na helixu H1.

Pro MD simulaci helixu H1 byla zvolena sekvence a) odpovídající residuím 7-34 modelu R-4 s 28 AMK a s celkovým nábojem -3 e (Obr. 30). K analýzám byly však využity jen tři části této sekvence. Pro helix H1 to byla b) sekvence z článku (Smajz et al. 1997), c) sekvence z nepublikovaných výsledků Mgr. Terezy Dolejšové, a d) sekvence zvolená na základě analýzy helicity. Zvolené sekvence jsou zvýrazněny modrou barvou:

- |    |                              |                  |
|----|------------------------------|------------------|
| a) | ANDEKAVLTKASEIIISVGDKAGEYLGD | (r 7-34, 28 AMK) |
| b) | ANDEKAVLTKASEIIISVGDKAGEYLGD | (r 9-32, 24 AMK) |
| c) | ANDEKAVLTKASEIIISVGDKAGEYLGD | (r 9-30, 22 AMK) |
| d) | ANDEKAVLTKASEIIISVGDKAGEYLGD | (r 7-31, 25 AMK) |



**Obr. 30:** První část obrázku obsahuje strukturu celé CTD kolicinu U z modelu R-4, ze které jsem vycházela. Tmavě modrou barvou je vyznačena část odpovídající H1 použité k MD simulaci (Cartoon zobrazení). Další část obrázku potom znázorňuje zvolenou strukturu helixu H1 po vložení do membrány POPC. V prvním případě bylo použito zobrazení NewCartoon, v druhém Surf s možností ResType. Barevné značení: červeně negativně a modře pozitivně nabitě AMK. Zelená barva označuje polární AMK a GLY, a bílá pak nepolární.

## 5.3 Vlastnosti H1 ve vodě a v membráně POPC

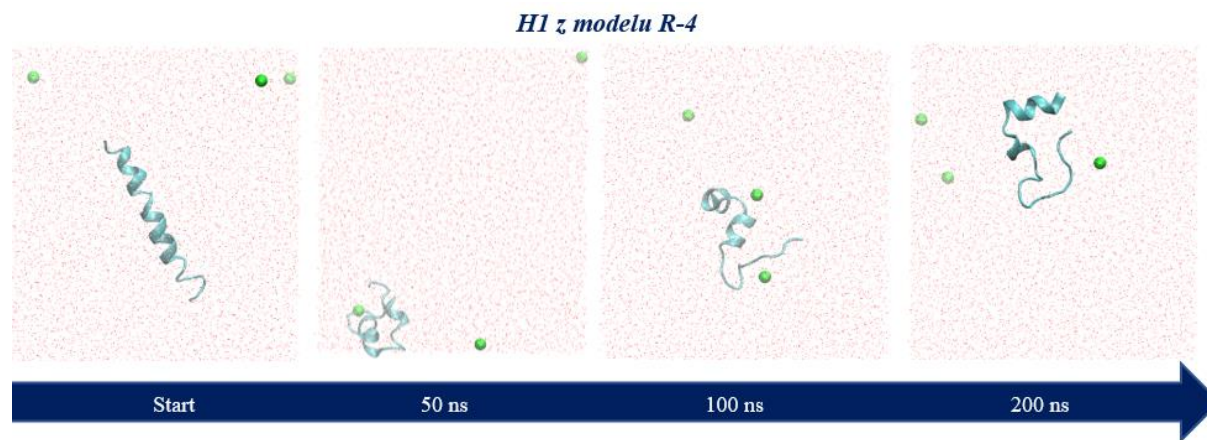
### 5.3.1 Vizualizace chování H1 v POPC membráně a ve vodě

Nejdříve byla provedena **MD simulace peptidu H1 v čisté vodě** s 3 protiionty  $\text{Na}^+$ . Vývoj jeho struktury v této simulaci je zachycen na Obr. 31. Ve vodě se jeho helikální struktura velmi brzo zhroutila, i když se v peptidu podle VMD průběžně udržovaly dvě až tři stabilní helikální oblasti. Peptid v této MD simulaci začal téměř okamžitě tvořit hůře rozpustnou strukturu. K tomu pravděpodobně také docházelo při jeho organické syntéze, která navazovala na MD simulace. Při ní jsem pozorovala, že syntetizovaný peptid nebyl rozpustný v destilované vodě. Rozpustit se ho podařilo až v 0,1% kyselině trifluoroctové. Vysvětlovala jsem si to tím, že surový H1 tvořil klastry. Purifikovaný peptid v destilované vodě však již rozpustný byl.

Pro MD simulaci peptidu H1 kolicinu U v membráně bylo zvoleno několik výchozích pozic. Všechny startovní pozice a vývoj jeho struktury v čase zobrazuje Obr. 32.

**Peptid H1 při nakloněném vertikálním vložení do membrány POPC z modelu R-4** měl tendenci zůstat ve vertikální orientaci do 300 ns. V tomto čase pomalu „helikalizoval“, a začínal

se tvořit „kink“ (sklon osy helixu o cca 35°). Nejstabilnější a nejvíce helikální struktury dosáhl po vytvoření kinku, kdy došlo prakticky k jeho rozdělení na 2 části – vertikální a horizontální.



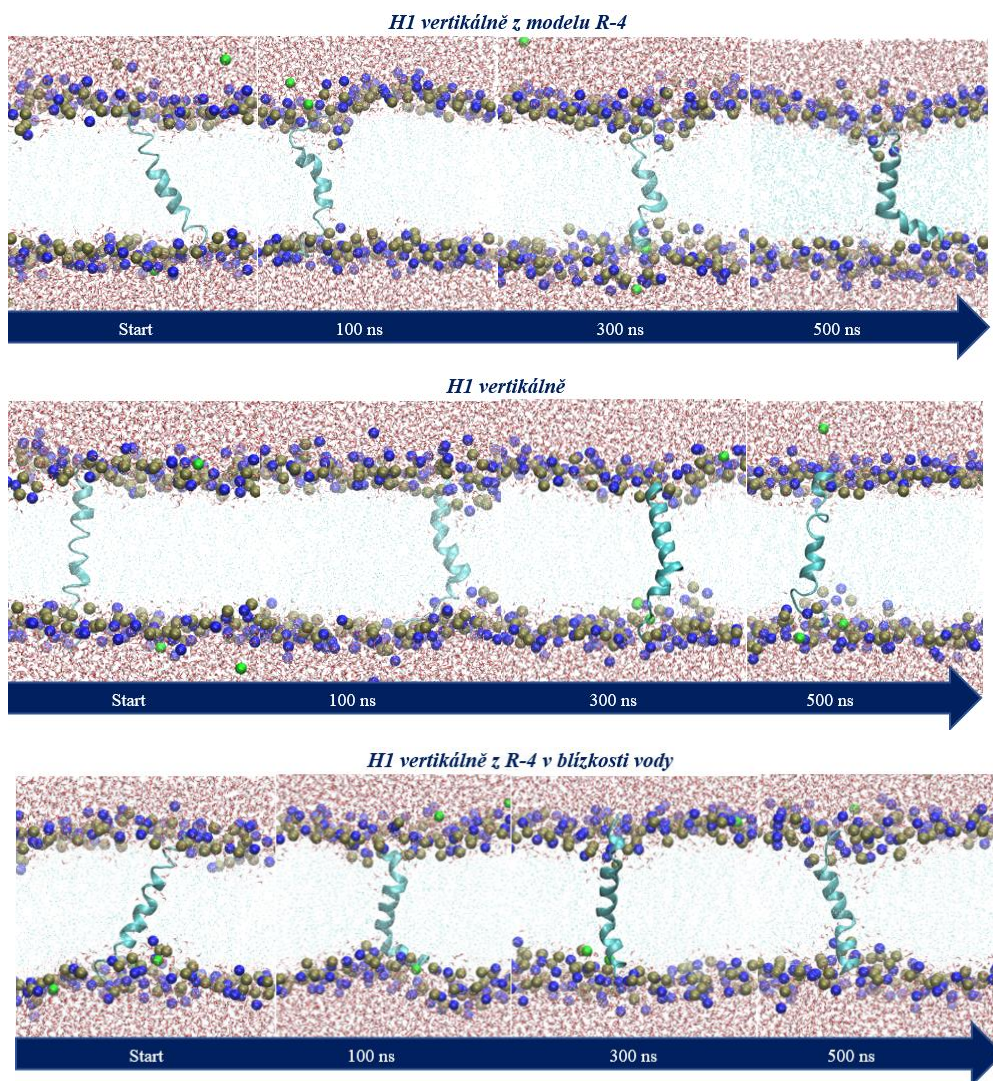
**Obr. 31:** VMD snímky v 0, 50, 100 a 200 ns MD simulace peptidu H1 v čisté vodě s 3 protiiionty Na<sup>+</sup>. Obrázky v horní části obsahují H1 (tyrkysově) se zobrazením NewCartoon, a ve spodní části H1 zobrazený pomocí QuickSurf. Molekuly vody (červeně) jsou znázorněny zobrazením Points, kationty sodíku (zeleně) jsou zobrazeny pomocí VDW.

**Peptid H1 vertikálně vložený do membrány POPC z modelu R-4** měl tendenci opět zůstat ve vertikální orientaci. Toto chování může být ale vynucené a způsobené umělými konci molekuly, které „kotví“ peptid v nabitých oblastech membrány z obou stran. Do 300 ns se struktura helikalizovala. Poté došlo k mírnému povytažení helixu v kladném směru osy z. To společně s natažením spodní části struktury H1, která interagovala s POPC hlavičkami spodní monovrstvy, mohlo mít vliv na ztrátu jeho helikální struktury.

**Peptid H1 při nakloněném vertikálním vložení do membrány POPC z modelu R-4 a v blízkosti molekul vody** se během celého časového intervalu 500 ns udržoval v membráně ve vertikální orientaci se strukturou transmembránového helixu s kinkem ve spodní části. V určitém čase MD simulace se projevil náznak i horního ohybu. Ke konci MD simulace se vytvořil kink uprostřed šroubovice.

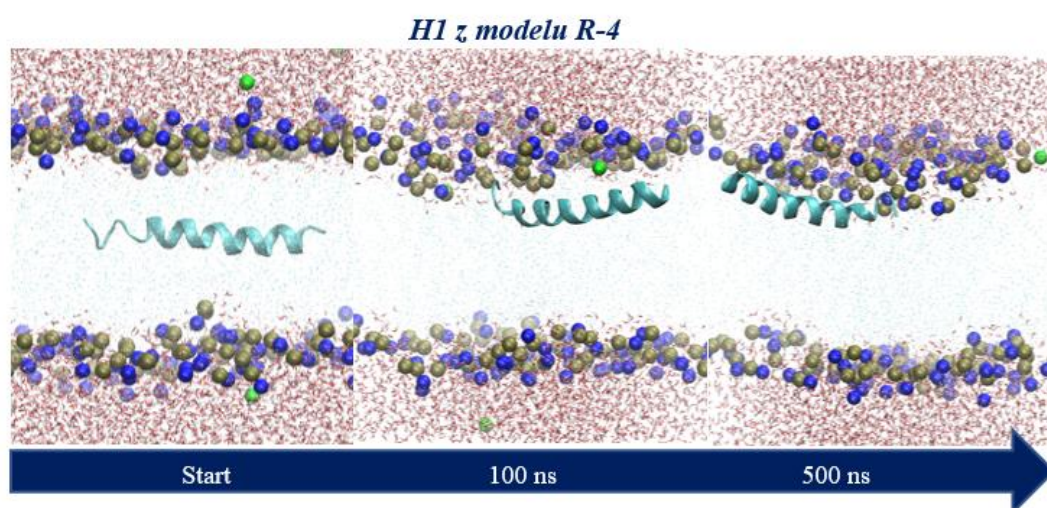
Ve všech těchto třech MD simulacích došlo k mírné kumulaci protiiiontů Na<sup>+</sup> blízko C-konce helixu. Na<sup>+</sup> ionty se dostaly až pod atomy P hlaviček POPC, ale pak se zase vrátily zpět do vodné fáze. Z vizualizace všech MD simulací H1 v POPC membráně dále vyplynulo, že hydrofobní prostředí jednoznačně prospívá jeho helicitě a dochází k tvorbě kinku. Zdá se, že spodní část

struktury za kinkem byla schopná přitáhnout část lipidových hlaviček spodní monovrstvy více ke středu membrány, nicméně lipidové hlavičky na intervalu 500 ns přes ohyb nepřešly dále. Občas byl v MD simulaci patrný náznak přitahování lipidových hlaviček i z horní monovrstvy membrány.



**Obr. 32:** VMD snímky v 0, 100, 300 a 500 ns MD simulace peptidu H1 v membráně POPC s 3 Na<sup>+</sup>. První řádek s obrázky obsahuje systém H1 v POPC membráně, přičemž struktura H1 byla při startu MD simulace v nakloněné vertikální orientaci z modelu R-4. Druhý řádek obsahuje strukturu H1 v čistě vertikální orientaci. Třetí řádek pak zachycuje vývoj struktury H1 v čase pro případ, kdy byly v její blízkosti při startu MD simulace molekuly vody. Barevné značení a styl zobrazení: Atomy P molekul POPC (zlatě, VDW), atomy N POPC (modře, VDW), ionty Na<sup>+</sup> (zeleně, VDW), molekuly vody (červeně, Bonds s menším vazebným poloměrem (0,1), ostatní atomy POPC (tyrkysově, Points), peptid (tyrkysově, NewCartoon).

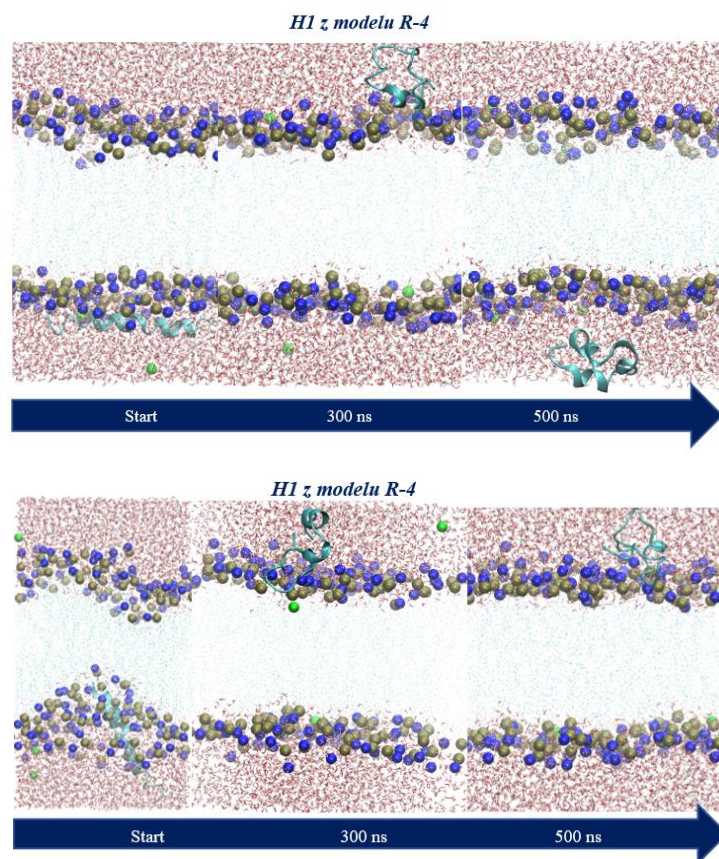
Peptid H1 se v membráně zřejmě strukturně stabilizoval, tím že podél jeho struktury proudily molekuly vody. Tyto interakce, které molekuly vody vytvářely se strukturou peptidu, pravděpodobně orientovaly jednotlivá residua H1 do pozic, které celkově podporovaly helicitu. Nejvíce patrná je tato skutečnost u helixu H1, který byl vložen do membrány v horizontální orientaci. Tam byla jeho stabilizace sekundární struktury umocněná interakcí s polárními hlavičkami membrány. Toto chování je v souladu s amfipaticitou helixu H1. Chování horizontálně vloženého H1 pod POPC hlavičky se opakovalo i v situaci, kdy byl peptid přidán přímo do středu membrány v horizontální pozici (Obr. 33). Jeho horizontálně orientovaná struktura se pouze přesunula do oblasti pod POPC hlavičky horní monovrstvy membrány.



**Obr. 33:** VMD snímky v 0, 100 a 500 ns MD simulace peptidu H1 v membráně POPC a s 3 protiiionty Na<sup>+</sup>. H1 byl vložen do membrány v horizontální orientaci do středu membrány. Barevné značení a styl zobrazení: Atomy P molekul POPC (zlatě, VDW), atomy N POPC (modře, VDW), ionty Na<sup>+</sup> (zeleně, VDW), molekuly vody (červeně, Bonds s menším vazebným poloměrem (0,1), ostatní atomy POPC (tyrkysově, Points), peptid (tyrkysově, NewCartoon).

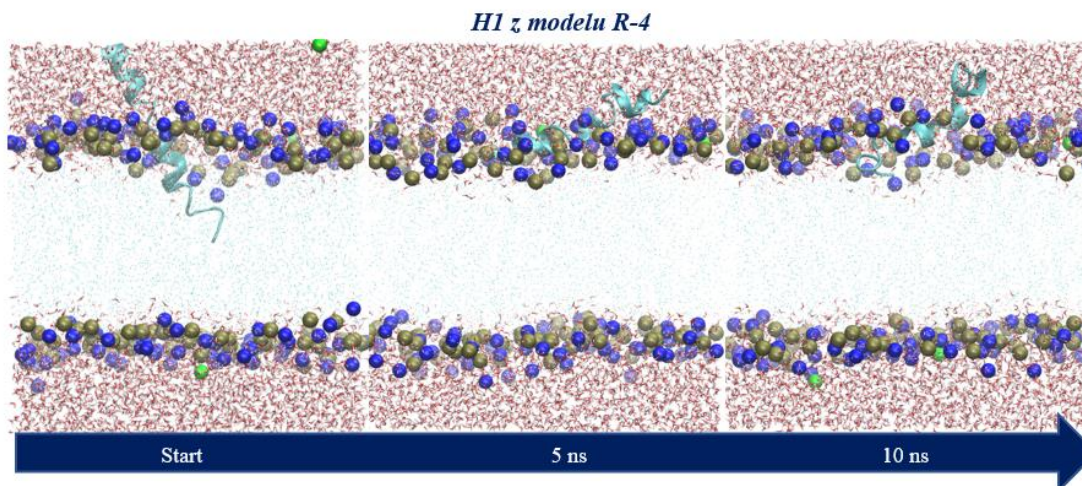
V doplňkových MD simulacích, kdy byl peptid H1 přidán do vodné fáze nad POPC hlavičky membrány ve vertikální (Obr. 34, horní) i horizontální orientaci (Obr. 34 spodní), nedošlo ani v jednom případě na intervalu 500 ns k jeho samovolnému zanoření do membrány. H1 opět tvořil hůře rozpustnou strukturu a v nich se pohyboval po polární části membrány. Roli v jeho chování mohly však hrát periodické okrajové podmínky boxu, neboť peptid mohl být elektrostaticky ovlivněn druhou polární monovrstvou membrány. V MD simulaci, kdy byl peptid H1 vložen do membrány pouze z jedné poloviny, tak aby jeho C-konec končil ve středu membrány

(Obr. 35), došlo k jeho samovolnému vysunutí z membrány. H1 se dále pohyboval v relativně helikální konformaci po POPC hlavičkách membrány ze strany vodní fáze. Jeho výstup z membrány se odehrál velmi rychle ( $\sim 1$  ns) a jeho interakce s nabitými hlavičkami membrány vedly nejspíše k tomu, že peptid nezačal tvořit hůře rozpustnou strukturu („klubíčko“), jako v případě MD simulace H1 v čisté vodě. MD simulace byla však zastavena na 10 ns, je tudíž možné, že by k tomu i v tomto případě mohlo ještě dojít.



**Obr. 34.:** VMD snímky v 0, 300 a 500 ns MD simulace peptidu H1 přiloženého k membráně v horizontální a vertikální pozici ve vodní fázi a s 3 protiionty  $\text{Na}^+$ . Barevné značení a styl zobrazení: Atomy P molekul POPC (zlatě, VDW), atomy N POPC (modře, VDW), ionty  $\text{Na}^+$  (zeleně, VDW), molekuly vody (červeně, Bonds s menším vazebným poloměrem (0,1), ostatní atomy POPC (tyrkysově, Points), peptid (tyrkysově, NewCartoon).





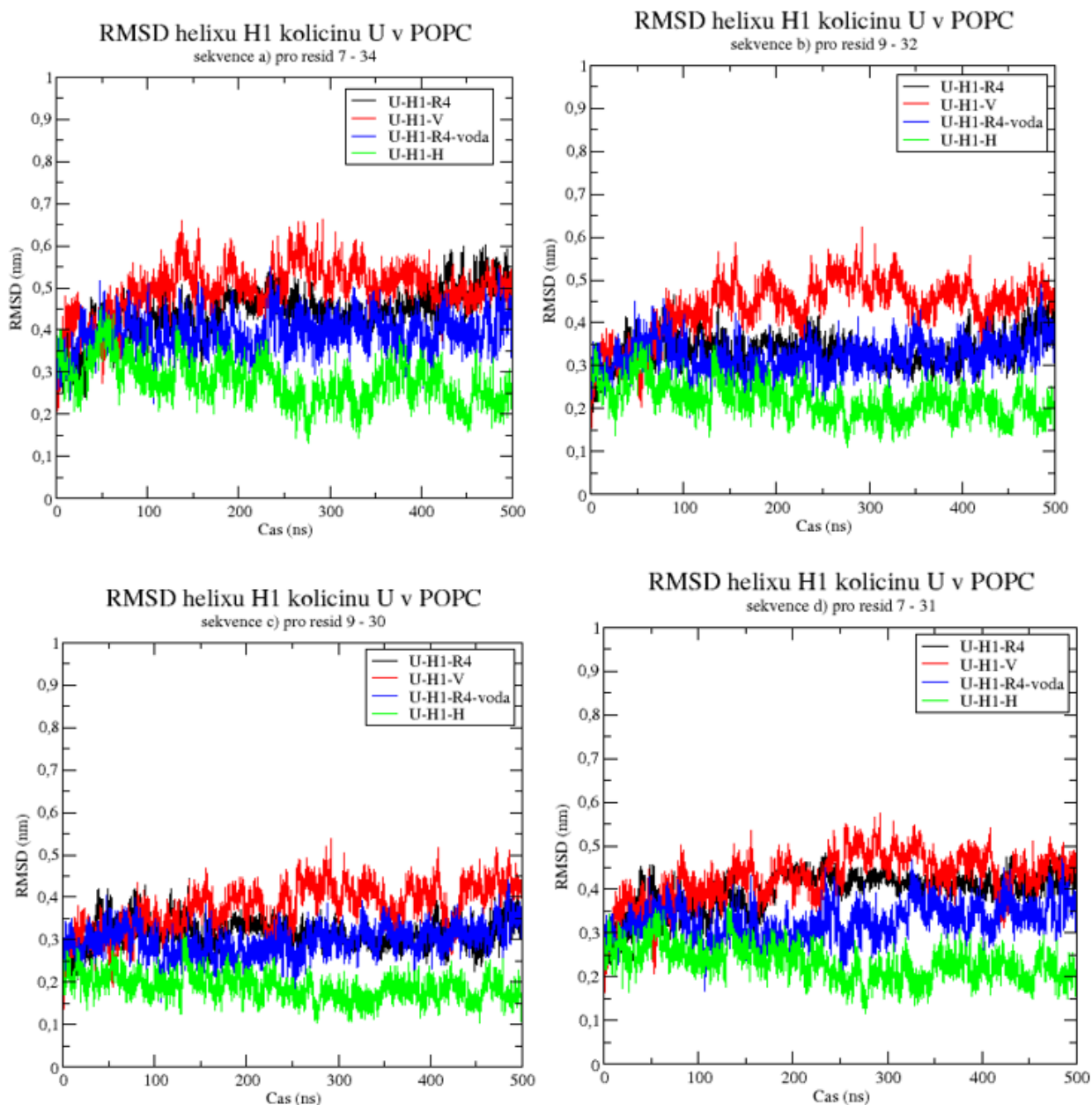
**Obr. 35:** Znázorněny jsou VMD snímky v 0 a 10 ns MD simulace peptidu H1 přiloženého do membrány z jedné poloviny tak, aby C-konec směřoval do středu POPC membrány. Barevné značení a styl zobrazení: Atomy P molekul POPC (zlatě, VDW), atomy N POPC (modře, VDW), ionty  $\text{Na}^+$  (zeleně, VDW), molekuly vody (červeně, Bonds s menším vazebným poloměrem (0,1), ostatní atomy POPC (tyrkysově, Points), peptid (tyrkysově, NewCartoon).

**Shrnutí pozorování chování H1 z VMD:** Peptid H1 se během časového intervalu 500 ns pohyboval v POPC membráně ve vertikální orientaci a udržoval si strukturu transmembránového helixu s kinkem. Jeho spodní část přitahovala protiionty  $\text{Na}^+$ . To mohlo být však částečně způsobeno umělým C-terminálním koncem molekuly. Ionty sodíku byly schopny se dostat do membrány až pod atomy fosforu POPC a často se lokalizovaly do oblasti ohybu H1. Poté se ale vždy vrátily zpět do vodné fáze. Ve vodě se helikální sekundární struktura H1 brzy zhroutila. Peptid začal vytvářet hůře rozpustnou strukturu. Helikální oblasti v jeho struktuře opakovaně zanikaly a vznikaly během 200 ns.

### 5.3.2 RMSD H1 v membráně POPC a ve vodě

Z výše uvedených VMD snímků je patrné, že se struktura peptidu chová v membráně poměrně stabilně. Ke kvantifikaci této stability je však třeba provést analýzu RMSD. RMSD udává odchylku struktury molekuly v daném čase vůči struktuře, kterou tato molekula zaujímala na začátku MD simulace. Je tak schopná informovat o rovnovážném chování molekuly.

Z grafů v Obr. 36 vyplývá, že se H1 chová v membráně POPC relativně rovnovážně. Struktura o sekvenci ANDEKAVLTKASEIIISVGDKAGEYLGD (c) má průměrně nejnížší RMSD s hodnotou 0.32 nm. Blíží se tedy nejvíce původní struktuře H1 při startu výpočtu. Jedná se ale zároveň o nejkratší zvolenou AMK sekvenci k analýze.



**Obr. 36:** Čtyři grafy RMSD helixu H1 kolicinu U pro čtyři zvolené sekvence a)-d). Analyzovány byly  $C\alpha$  atomy AMK. RMSD informuje o změně struktury v průběhu MD simulace vůči struktuře při jejím startu. Čím více je křivka rovnoběžná, tím více je struktura rovnovážná a stabilní v čase. U-H1-R4 odpovídá MD simulaci, ve které byl H1 vložen do POPC membrány vertikálně s

náklonem, U-H1-V představuje MD simulaci peptidu H1 vloženého na počátku do POPC v čisté vertikální orientaci. U-H1-R4-voda je záznam z MD simulace, ve které byla při spuštění výpočtu MD v blízkosti struktury H1 voda, U-H1-H zachycuje situaci, ve které byl peptid H1 vložen do POPC horizontálně. Použitý program pro tvorbu grafů byl Grace.

Co se týče orientace, nejvíce se původní sekundární struktura z R-4 modelu blížil H1 vložený do membrány horizontálně. Jeho RMSD se v průběhu pohybu v membráně mírně snižovala až na hodnotu 0.125 nm. Nejstabilněji se pro všechny zvolené sekvence choval peptid H1, který měl v blízkosti své struktury molekuly vody (modře označen) při spuštění MD simulace. Nejvíce „nerovnovážné chování“ měl peptid H1, který byl vložen do membrány ve vynucené přímé vertikální orientaci. Helix H1 měl celkově tendenci zaujímat v membráně pozici s náklonem a vynucená vertikální orientace ho nejspíše přinutila k větší změně ve struktuře.

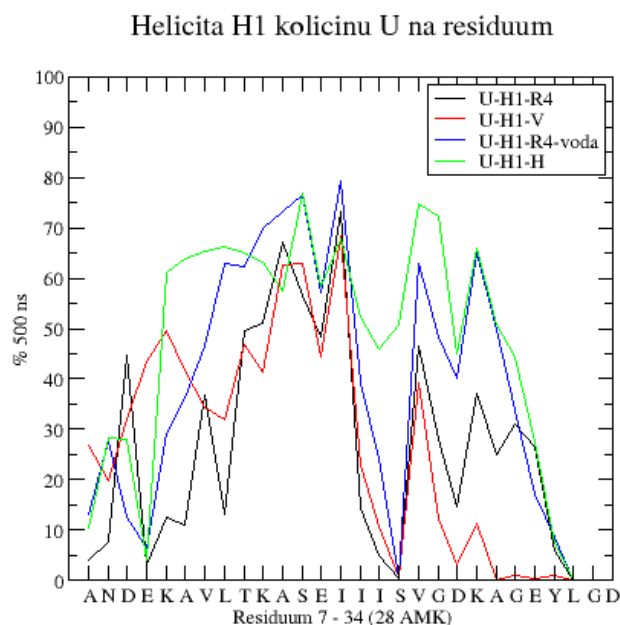
Pro všechny následné srovnávací analýzy ostatních simulovaných peptidů s peptidem H1 jsem na základě těchto výpočtů RMSD zvolila trajektorii se strukturou U-H1-R4-voda, která se chovala nejstabilněji. Na základě těchto grafů jsem se dále rozhodla využít celý časový interval 500 ns pro následné analýzy sklonu peptidu H1 v membráně (pro určité části sekvence), hustotního profilu a sekundární struktury. U některých ostatních helixů to nebylo možné vzhledem k jejich vysoké hodnotě RMSD a nestabilnímu chování. V jejich případě byl zvolen k analýzám časový interval odpovídající rovnovážnému chování, nebo analýza nebyla vůbec provedena.

### 5.3.3 Helicita H1 v membráně POPC

Z VMD snímků bylo vidět, že se v průběhu simulace peptidu H1 v membráně měnila jeho helikální struktura. Tomu pravděpodobně i odpovídaly výchylky křivek RMSD. Z toho důvodu byla provedena analýza helicity. Ta poskytuje informaci o tom, která residua jsou helikální a v kolika % času trajektorie. Analýza helicity H1 v POPC membráně je zobrazena na Obr. 37, ve kterém jsou na ose x jednopísmenná označení AMK sekvence H1 od jeho N-konce k C-konci. První residuum odpovídá ALA7 strukturního modelu R-4.

Z této provedené analýzy vyplývá, že všechny peptidy H1, které byly vloženy do membrány POPC vertikálně, tvořily zlom v residuu SER23. Tato aminokyselina nebyla u žádného vertikálního H1 kolicinu U na celém intervalu 500 ns nikdy helikální. V případě horizontálně vloženého H1 do POPC se SER23 uplatňoval také v ohybu, nicméně v 50 % jeho 500 ns MD

simulace byl helikální. Z tohoto grafu lze dále vidět, že nejvíce helikální vertikálně orientovaný H1 byl ten, který měl v okolí své struktury molekuly vody. V této struktuře se vytvářely celkem 4 ohyby. První zlom byl v oblasti GLU10. Totéž platí i pro strukturu H1 vloženou do membrány vertikálně pod náklonem (U-H1-R4) a horizontálně vloženou strukturu H1 do membrány (U-H1-H). Již zmíněný největší zlom byl v residuu SER23, který se podle kritérií helicity na šroubovicové struktuře H1 v 500ns simulaci vůbec nepodílel. Další ohyb byl v GLU19, ten byl opět společný všem strukturám H1, a v ASP26. I tento ohyb byl v grafu zachycen pro všechny struktury H1. LEU32, GLY33 a ASP34 se na helikální struktuře H1 vůbec nepodílely.



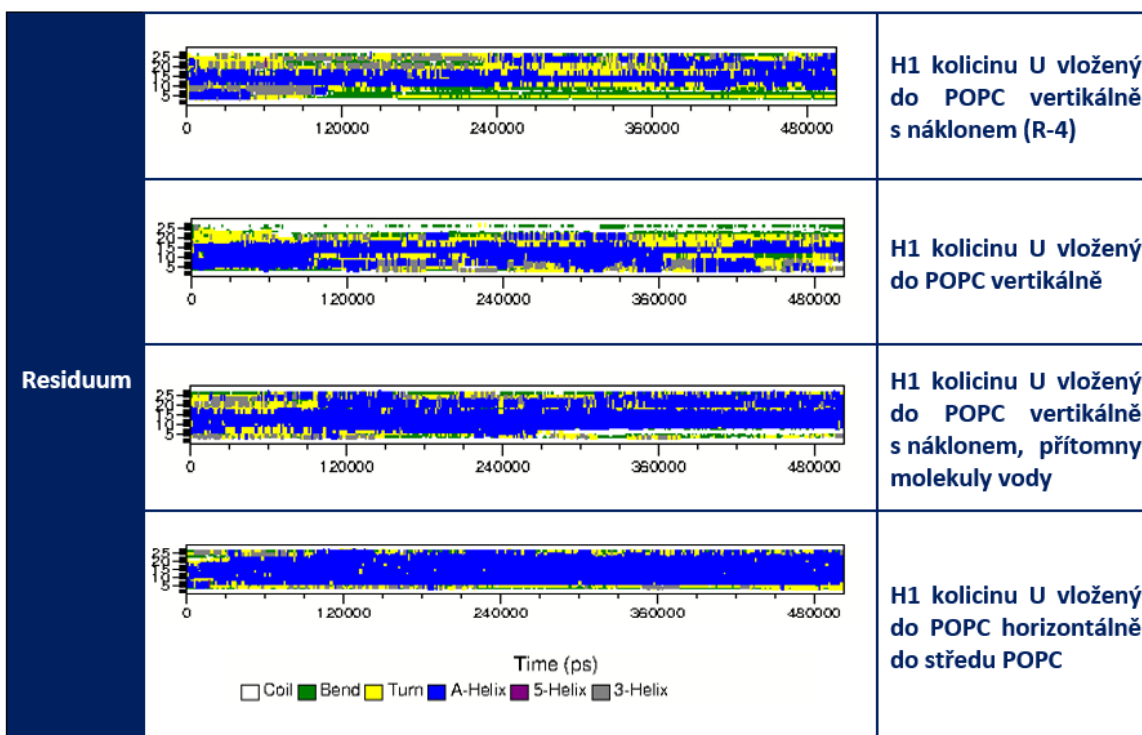
**Obr. 37:** Helicita na jedno residuum pro helix H1 kolicinu U. Osa x odpovídá jednopísmennému označení celé aminokyselinové sekvence H1 zvolené k MD simulaci. Osa y potom vyjadřuje, jak moc helikální je dané residuum v průběhu MD simulace. U-H1-R4 odpovídá MD simulaci, ve které byl H1 vložen do POPC membrány vertikálně s náklonem, U-H1-V představuje MD simulaci peptidu H1 vloženého na počátku do POPC v čistě vertikální orientaci. U-H1-R4-voda je záznam z MD simulace, ve které byla při spuštění výpočtu MD simulace v blízkosti struktury H1 voda, U-H1-H zachycuje situaci, ve které byl peptid H1 vložen do POPC horizontálně (Grace).

### 5.3.4 Sekundární struktura H1 v membráně POPC

Na základě předchozího grafu jsem si položila otázku: pokud určitá část sekvence H1 není  $\alpha$ -helikální, tak jakou strukturu má? Je to 3-helix nebo nestrukturovaná oblast? Odpovědět na tuto

otázku je schopná analýza sekundární struktury vypočítaná programem DSSP. Ta umožňuje sledovat vývoj sekundárních struktur jednotlivých AMK zbytků (osa y) v čase (osa x). V grafu těchto analýz bylo použito číslování residuů na ose y od jedničky kvůli přehlednosti. Pro helix H1 první očíslované residuum v grafu odpovídá ALA7 strukturního modelu R-4. Toto jednoduché číslování bylo zvoleno kvůli porovnávání s modely, ve kterých první residuum helixu H1 odpovídalo např. číslu 301.

Z analýzy sekundární struktury peptidu H1 v POPC membráně (Obr. 38) opět vyplývá, že všechny vertikálně vložené helixy v membráně tvořily zlom v residuu čísla 17 (tj. SER23), a že nejvíce  $\alpha$ -helikální H1 byl ten, který měl v membráně při spuštění výpočtu v blízkosti molekuly vody. Zdá se tedy, že molekuly vody měly na sekundární strukturu H1 v membráně stabilizační efekt. Neboť i vývoj H1 struktury, která byla v membráně při startu MD bez vody, směřoval stejným směrem - pokaždé membránou začala protékat voda a peptid postupně helikalizoval. Výjimkou je H1 vložený do POPC v čistě vertikální orientaci. Jeho helicity by vzrůstala, ale na 360 ns došlo k jejímu rozrušení. Struktura 3-helixu se často objevuje u H1 v POPC membráně bez vody v jejím okolí při startu MD.



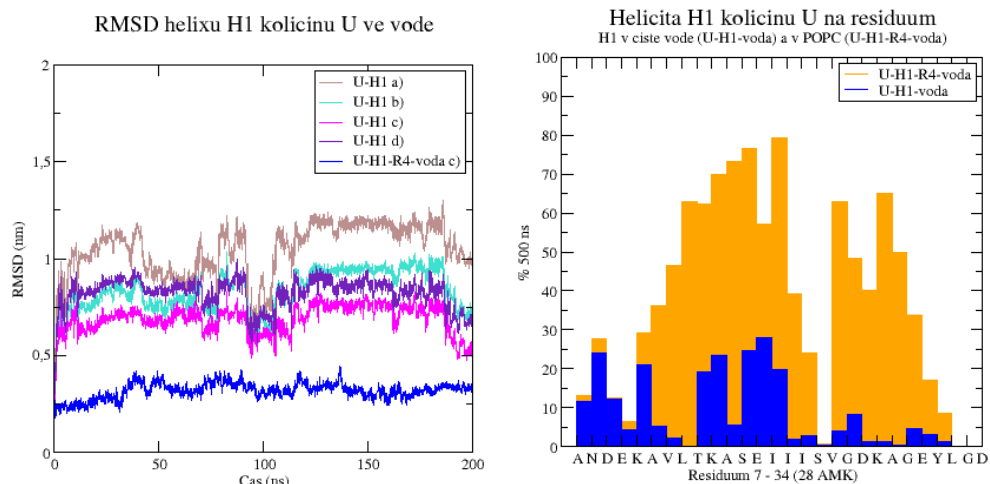
**Obr. 38:** Celkové srovnání sekundárních struktur jednotlivých H1 v POPC membráně (DSSP).

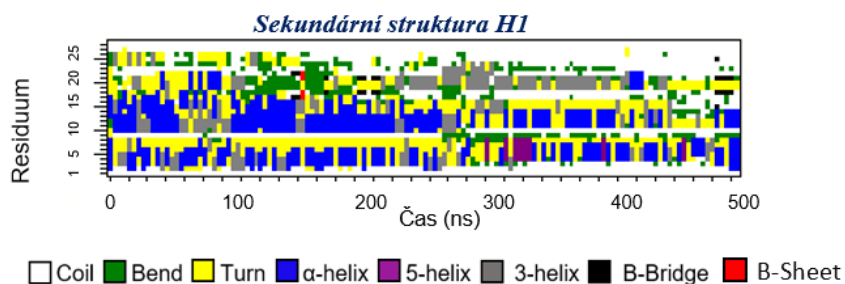
### 5.3.5 RMSD, helicitu a sekundární struktura H1 v čisté vodě s protiionty

Následující grafy (Obr. 39) zobrazující chování H1 ve vodě, které je obvykle porovnáváno s chováním H1 v POPC membráně (systém U-H1-R4-voda). První graf znázorňuje RMSD struktury peptidu, kterou peptid zaujímal v boxu s čistou vodou a protiionty. Čtyři křivky v tomto grafu odpovídají čtyřem zvoleným sekvencím pro analýzu. Spodní tmavě modrá křivka odpovídá MD simulaci, kdy byl peptid vložen do POPC membrány ve vertikální orientaci s náklonem a v jeho blízkosti byly molekuly vody (U-H1-T4-voda). Jak z grafu vyplývá, struktura peptidu ve vodě se během 200 ns velmi odlišovala od struktury na počátku simulace. Dochází k jejím velkým strukturálním změnám.

Druhý graf ukazuje, v kolika procentech času trajektorie je residuum ideálně helikální. Zobrazení křivky v grafu helicity je „pravoschodé“, tzn. že nehelikálnímu SER23 v grafu odpovídá část za písmenným označením residua. Toto zobrazení bylo zvoleno kvůli vyniknutí podobného chování části sekvence na N-konci H1. Porovnána byla 200ns simulace H1 ve vodě a 500ns MD simulací H1 v membráně. Peptid ve vodě se totiž pohyboval mnohem rychleji než v membráně. K porovnání jeho helicity v membráně byla opět zvolena nakloněná struktura R4 v kontaktu s vodou. Strukturu peptidu H1 ve vodě tvořily tři helikální oblasti, resp. čtyři. Toto chování částečně připomínalo situaci, kdy byl peptid H1 v membráně. První část struktury (sekvence ANDEKA) H1 ve vodě se helicitou blížila nejvíce chování peptidu H1 v membráně POPC. SER23 opět nebyl helikální a tvoří ohyb struktury i v této MD simulaci.

Poslední graf ukazuje, jakou sekundární strukturu zaujímají AMK zbytky v daném čase trajektorie. Z grafu je vidět, že residuum s pozicí 7 (VAL13) a 8 (LEU14), 17 (SER23) částečně oddělují jednotlivé helikální oblasti struktury, které se v průběhu simulace objevují a opětovně zanikají.





**Obr. 39:** Analýza RMSD, helicity a sekundární struktury peptidu H1 v čisté vodě s protioionty (U-H1). Pro srovnání je uvedeno i chování H1 vloženého do membrány ve vertikální orientaci s náklonem a v přítomnosti molekul vody u jeho struktury (U-H1-R4-voda).

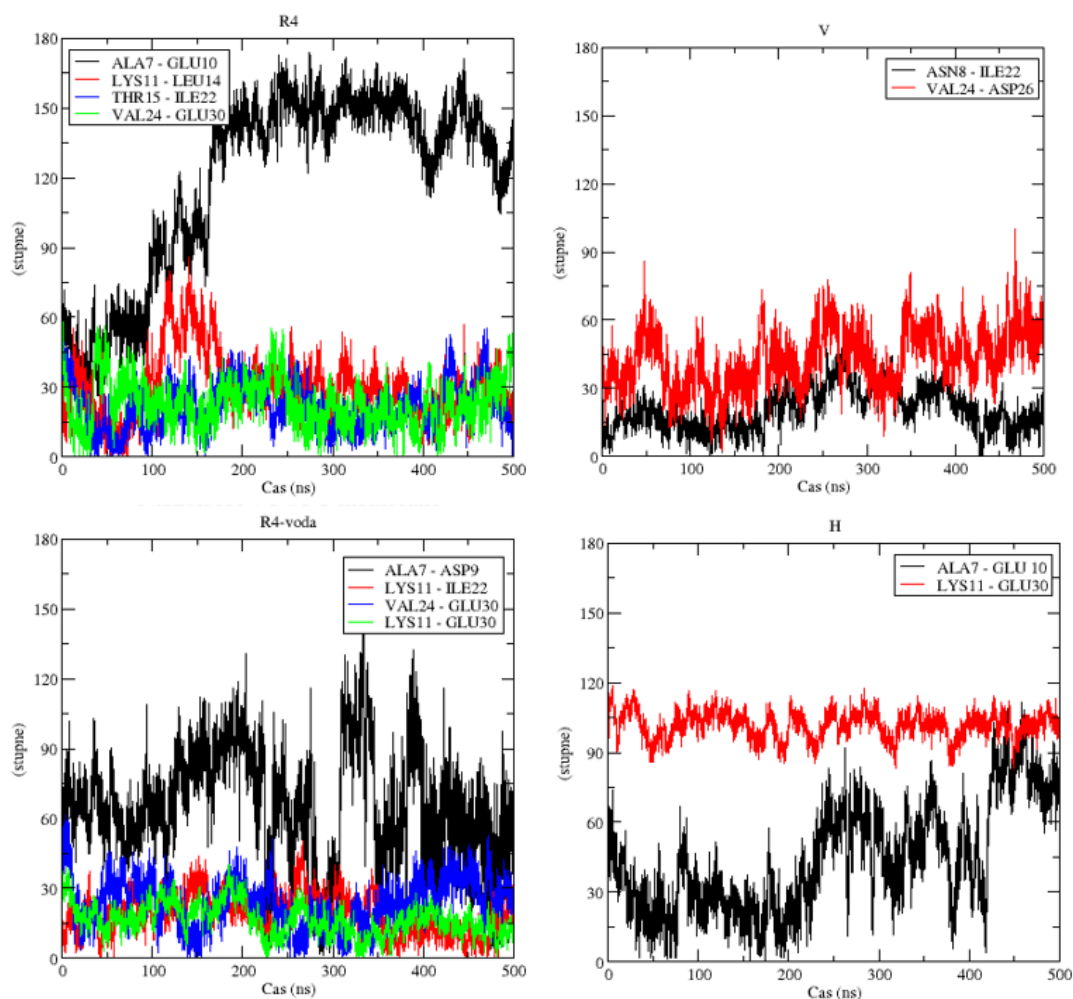
### 5.3.6 Sklon H1 v membráně POPC

Se zohledněním výsledků z analýzy RMSD a helicity jsem určila sklon H1 v lipidové membráně POPC pomocí analýzy *g\_bundle*. Principem této analýzy je natažení vektoru mezi dvěma (ev. třemi pro kink) zvolenými body struktury. Jako referenční osa byla zvolena osa z. Tzn. že nulová hodnota v grafu odpovídala jeho vertikální orientaci. Náklon pod úhlem  $90^\circ$  potom zachycoval orientaci horizontální. Na základě analýzy helicity jsem zvolila pro natažení vektoru napříč strukturou H1 pouze její jednotlivé části. Atomy  $C\alpha$  AMK, mezi kterými byl veden vektor rovnoběžný s osou z, jsou následující:

- **U-H1-R4:** ALA7-GLU10, LYS11-LEU14, THR15-ILE22
- **U-H1-R4-voda:** ALA7-ASP9, LYS11-ILE22, VAL24-GLU30, LYS11-GLU30, kink
- **U-H1-V:** ASN8-ILE22, VAL24-ASP26
- **U-H1-H:** ALA7-GLU10, LYS11-GLU30

Z grafu (Obr. 40) v případě systému **U-H1-R4** vyplývá, že chování sekvencí THR15-ILE22 a VAL24-GLU30 bylo navzájem velmi podobné. Od 200 ns se obdobně chovala i sekvence LYS11-LEU14. Tyto části struktury byly ve vertikální orientaci a pohybovaly se průměrně pod úhlem  $28^\circ$ . Od 250 do 450 ns byl tento náklon poměrně stabilní. Část struktury o sekvenci ALA7-ASP9 se od cca 100 ns do 200 ns udržovala v orientaci horizontální. Poté se překloupila zpět do téměř vertikální orientace s opačnou orientací, než měla původně.

V případě systému **U-H1-V** (Obr. 40) je patrné, že vnucená čistě vertikální orientace peptidu při startu MD simulace byla téměř ihned ztracena. Struktura o sekvenci ASN8-ILE22 se opět začala pohybovat nejčastěji pod úhlem  $30^\circ$ . Vektor mezi rezidui VAL24-ASP26 byl vůči ose z v nakloněné horizontální pozici.



**Obr. 40:** Náklon částí struktury H1 v POPC membráně. 4 grafy odpovídají 4 různým MD simulacím H1 v POPC membráně. U-H1-R4 odpovídá MD simulaci, ve které byl H1 vložen do POPC membrány vertikálně s náklonem, U-H1-V představuje MD simulaci peptidu H1 vloženého na počátku do POPC v čistě vertikální orientaci. U-H1-R4-voda je záznam z MD simulace, ve které byla při spuštění výpočtu MD simulace v blízkosti struktury H1 voda, U-H1-H zachycuje situaci, ve které byl peptid H1 vložen do POPC horizontálně. V legendě jsou AMK zbytky, mezi kterými byl veden vektor. Grafy byly vygenerovány programem Grace.



Z grafu (Obr. 40) v případě systému **U-H1-R4-voda** je vidět, že struktura o sekvence LYS11-GLU30 s kinkem v SER23 se opět vyskytovala v POPC membráně pod mírným náklonem vůči ose z. Střídavě se nakláněla více a méně o několik málo desítek stupňů. Pouze v cca 230 ns, 340ns a v 490 ns byla jeho orientace téměř čistě vertikální bez náklonu. Zdá se, že se rozpětí náklonu postupně snižovalo. Spodní část struktury o sekvenci VAL24-GLU30 měla hodnotu rozpětí mnohem větší. Zatímco náklon předchozí sekvence od času 220 ns pomalu klesal, u této sekvence (která je součástí té předchozí) se naopak zdá, že se její náklon postupně zvyšoval. Klesání náklonu struktury celé sekvence LYS11-GLU30 s ohybem bylo nejspíše dáno průměrováním horní a spodní části celé sekvence. Náklon její horní části LYS11-ILE22 totiž od 350 ns značně poklesl (na 490 ns se pak ale opět začal zvedat). ALA7-ASP9 jsem do celkové analyzované sekvence vůbec nezahrnula, vzhledem k předchozím analýzám helicity. A jak je vidět z grafu, orientace těchto 3 AMK v membráně byla spíše horizontální.

Systém **U-H1-H** (Obr. 40) v grafu (H) ilustruje své horizontální chování na sekvenci LYS11-GLU30. I horizontální struktura této sekvence však kmitala v rozmezí 0 až 30 °. Struktura ALA7-GLU10 se vyskytovala v membráně ve vertikální orientaci do 200 ns. Poté měla několikrát tendenci se překloupat na horizontální orientaci. Povedlo se jí tu však až po cca 410 ns.

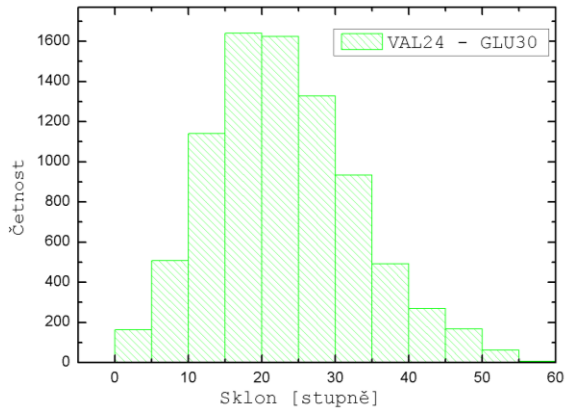
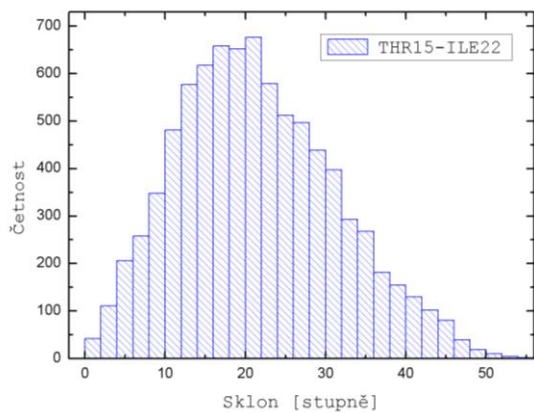
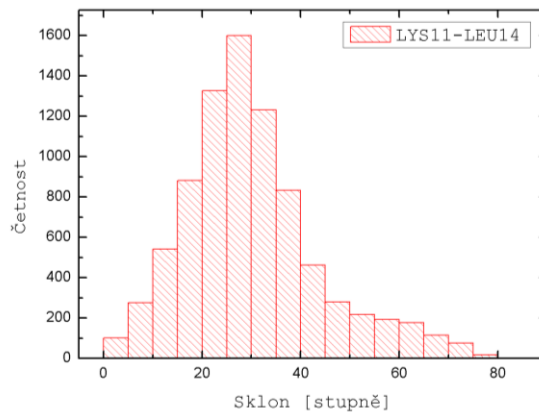
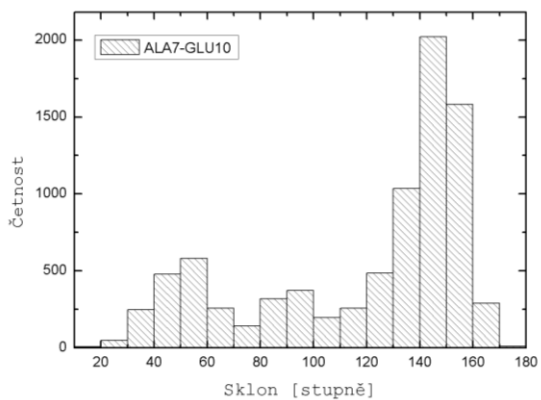
Histogramy nejčastěji zastoupených úhlů sklonu peptidu H1 v POPC membráně jsou na Obr. č.41. V systému **U-H1-R4** byl nejčastěji náklon struktury o sekvenci LYS11-LEU14 27 °, THR15-ILE22 20 °, VAL24-GLU30 18 °. Sekvence ALA7-GLU10 má nejčastější úhel náklonu 145 °.

Sekvence ASN8-ILE22 vertikálně vloženého H1 do POPC membrány (**U-H1-V**) byla nejčastěji pod náklonem 17 °. Náklon VAL24-ASP26 byl 32 °.

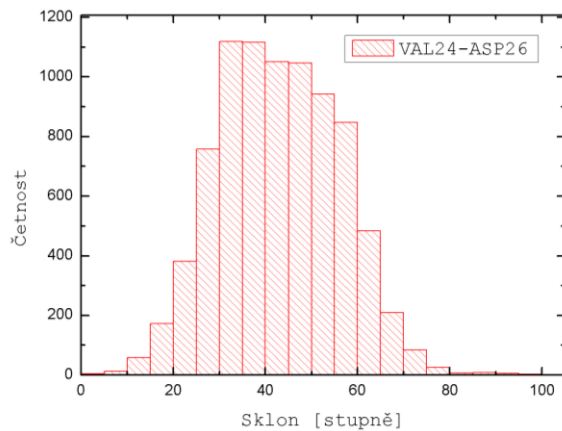
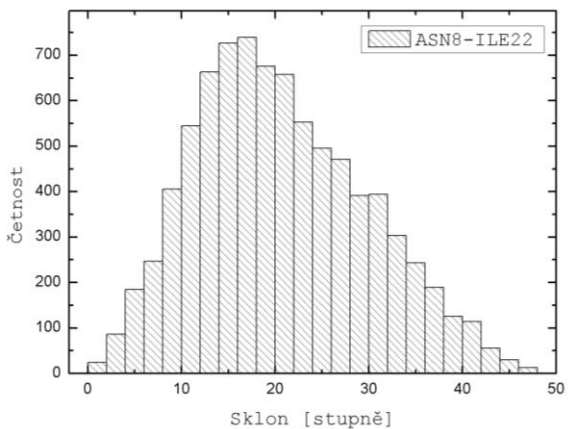
Pro **U-H1-R4-voda** celá helikální AMK sekvence LYS11-GLU30 se v 500ns simulaci nejčastěji vyskytovala v membráně pod náklonem 15 ° vůči referenční ose z. AMK sekvence LYS11-ILE22 se v největší míře vyskytovala pod úhlem 23 °. Sekvence obsahující VAL24-GLU30 měla nejčastější hodnotu také 23 °. Nejvíce se vyskytující orientace struktury o sekvenci ALA7-ASP9 z H1 v membráně byla pod úhlem 65 °.

V případě horizontálního vložení peptidu do membrány (**U-H1-H**) byla struktura sekvence ALA7-GLU10 v membráně nejčastěji pod 22 °. Struktura LYS11-GLU30 měla nejčastější úhel náklonu 105 °.

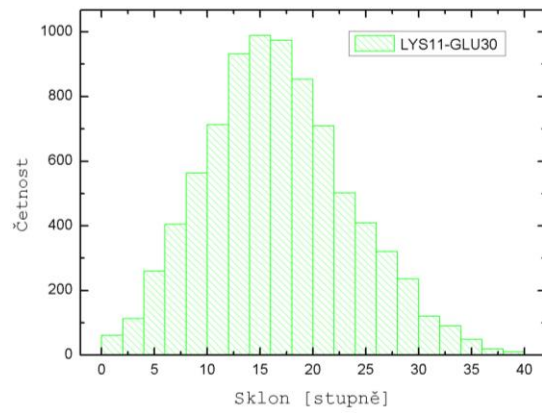
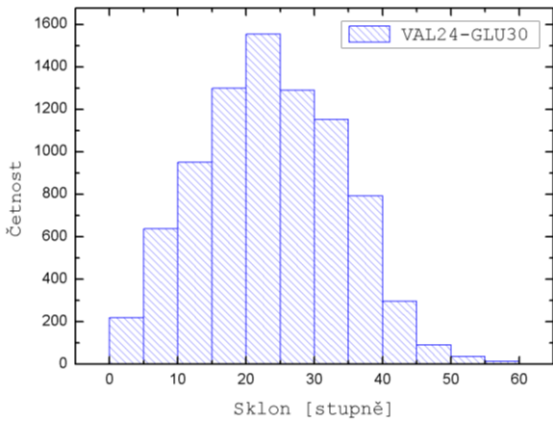
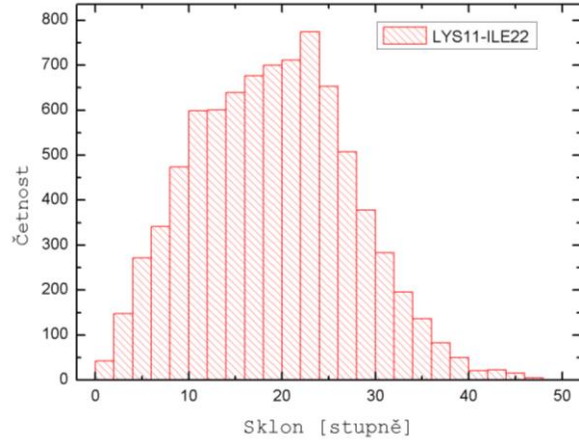
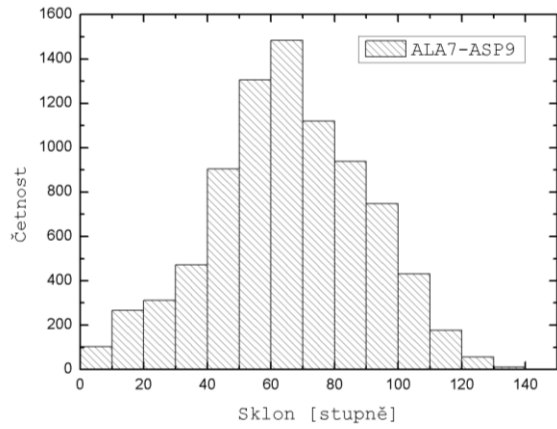
***U-H1-R4***



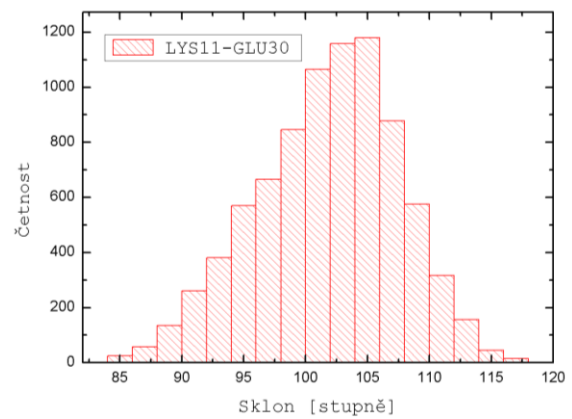
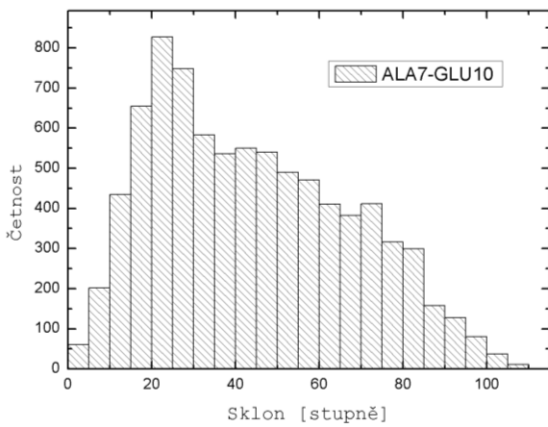
***U-H1-V***



***U-H1-R4-VODA***



### *U-H1-H*



**Obr. 41:** Histogramy náklonu částí struktury H1 v POPC membráně (Origin8).

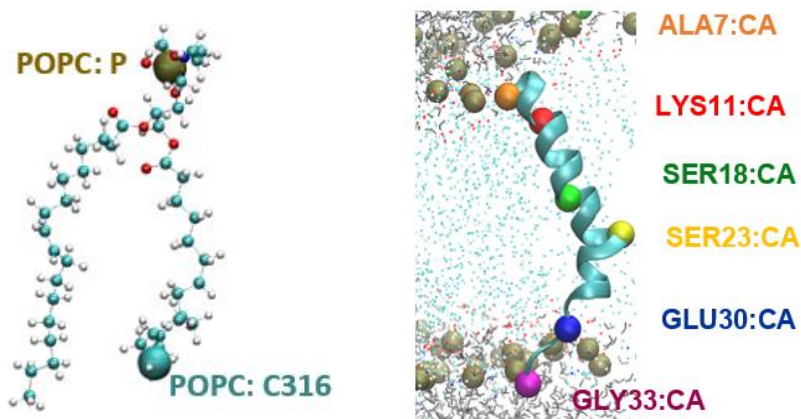
Shrnutí pro nejčastější úhly sklonu částí struktury peptidu H1 v POPC membráně je v Tab. 11.

Nejčastější náklon H1 v POPC membráně			
U-H1-R4	U-H1-V	U-H1-R4-voda	U-H1-H
ALA7-GLU10 145 °	ASN8-ILE22 17 °	ALA7-ASP9 65 °	ALA7-GLU10 22 °
LYS11-LEU14 27 °	VAL24-ASP26 32 °	LYS11-ILE22 23 °	LYS11-GLU30 105 °
THR15-ILE22 20°		VAL24-GLU30 23 °	
VAL24-GLU30 18 °		LYS11-GLU30 15 °	

**Tab. 11:** Nejčastější úhel náklonu sekvence H1 v POPC membráně.

### 5.3.7 Hustotní profil H1 v membráně POPC

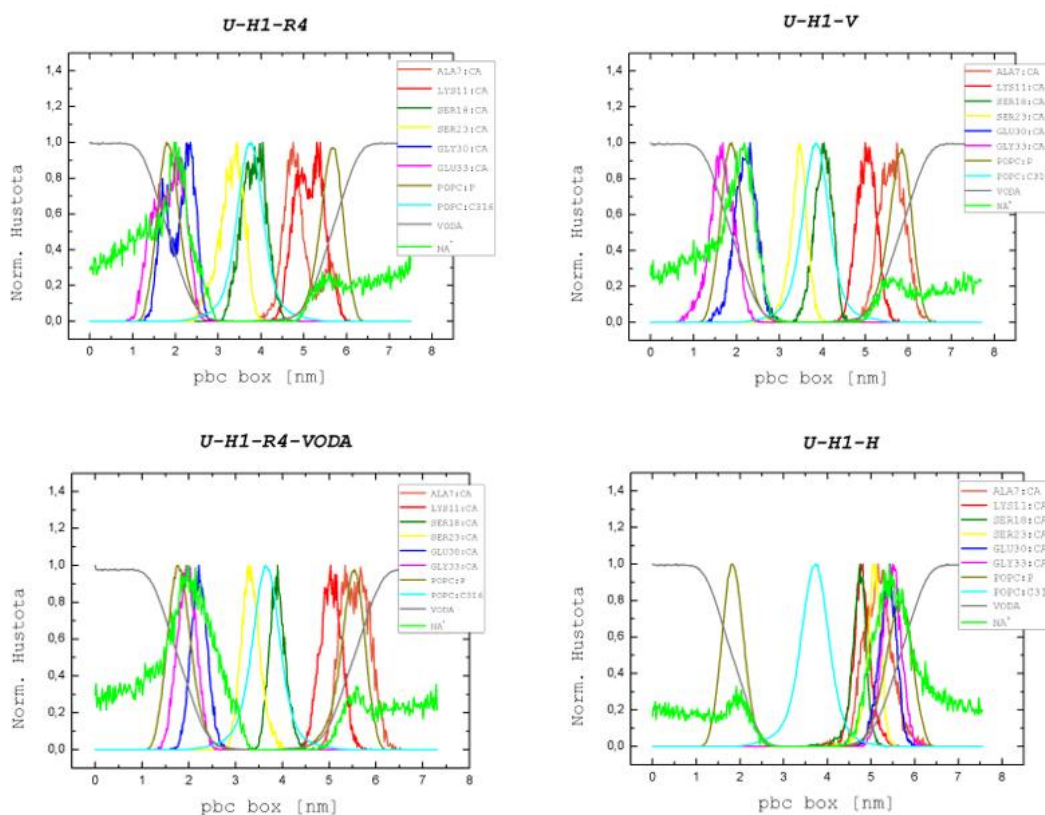
Z předchozích uvedených VMD snímků H1 v membráně je patrné, že z jeho jedné strany proudí membránou molekuly vody. Z toho důvodu jsem se rozhodla udělat analýzu hustotního profilu. Tato analýza je schopná poskytnout informace o tom, v jaké oblasti membrány se daný atom, např. C $\alpha$  dané AMK, vyskytuje. Hustotní profil zadaných atomů lze vypočítat nástrojem *g\_density*. Atomy, které byly zvoleny pro sledování v průběhu MD simulace, jsou na Obr. 42. Z membrány POPC jsem vybrala atomy C316 zastupující hydrofobní oblast POPC a poté atomy P z polární oblasti POPC membrány. Z H1 peptidu jsem zvolila C $\alpha$  ALA7, LYS11, SER18, SER23, GLU30, GLY33.



**Obr. 42:** Zvolené atomy POPC a H1 pro analýzu hustotního profil (VMD zobrazení).

Z grafů hustotního profilu zvolených C $\alpha$  H1 je patrné, že dochází ke kumulaci protiiontů Na<sup>+</sup> na jeho C-konci. Toto chování bylo zřejmé již z vizualizace průběhu trajektorie: Na<sup>+</sup> ionty se

dostávaly blízko k oblasti ohybu, kde měly tendenci setrvat. Nelze zatím ale vyloučit, že jejich kumulace na této straně peptidu je daná negativně nabitým umělým C-koncem H1. V případě systému U-H1-R4-VODA docházelo k jejich průniku do hydrofobní monovrstvy membrány nejvíce (~3,4 nm boxu). Také je zřejmé, že za jejich atrakci do membrány je zodpovědná GLU30. Poté však, co protionty do membrány již jednou proniknou, jsou schopny interagovat s další vhodně nabitou AMK H1 v hydrofobní části POPC membrány.



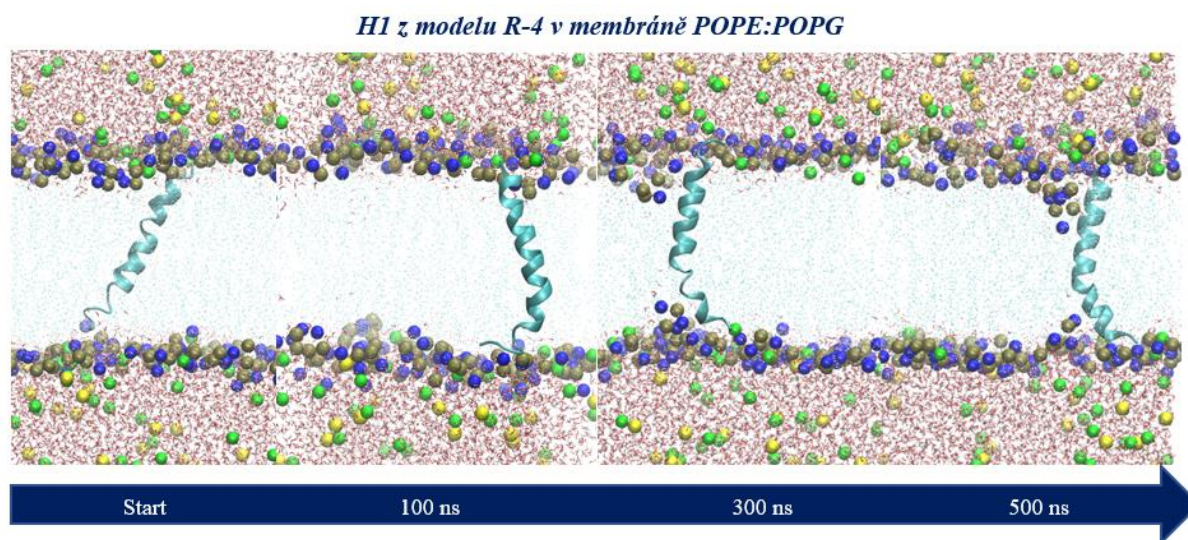
**Obr. 43:** Hustotní profil pro H1 kolicinu U v POPC membráně. Všechny datové soubory hustoty (osa y) byly znormalizovány podle maxima. Střed grafu (3,75 nm) odpovídá hydrofobní oblasti membrány zastoupené atomy C315 POPC. Oblasti atomů P (polární části monovrstev) jsou zobrazeny oranžovou barvou. Grafy byly vygenerovány v Origin8.

## 5.4 Srovnání vlastností H1 v membráně POPC a membráně mimikující *E. coli*

V průběhu studia chování H1 kolicinu U v POPC membráně jsem si položila otázku, jak moc by jeho chování záviselo na typu použité membrány. Proto jsem provedla i MD simulaci

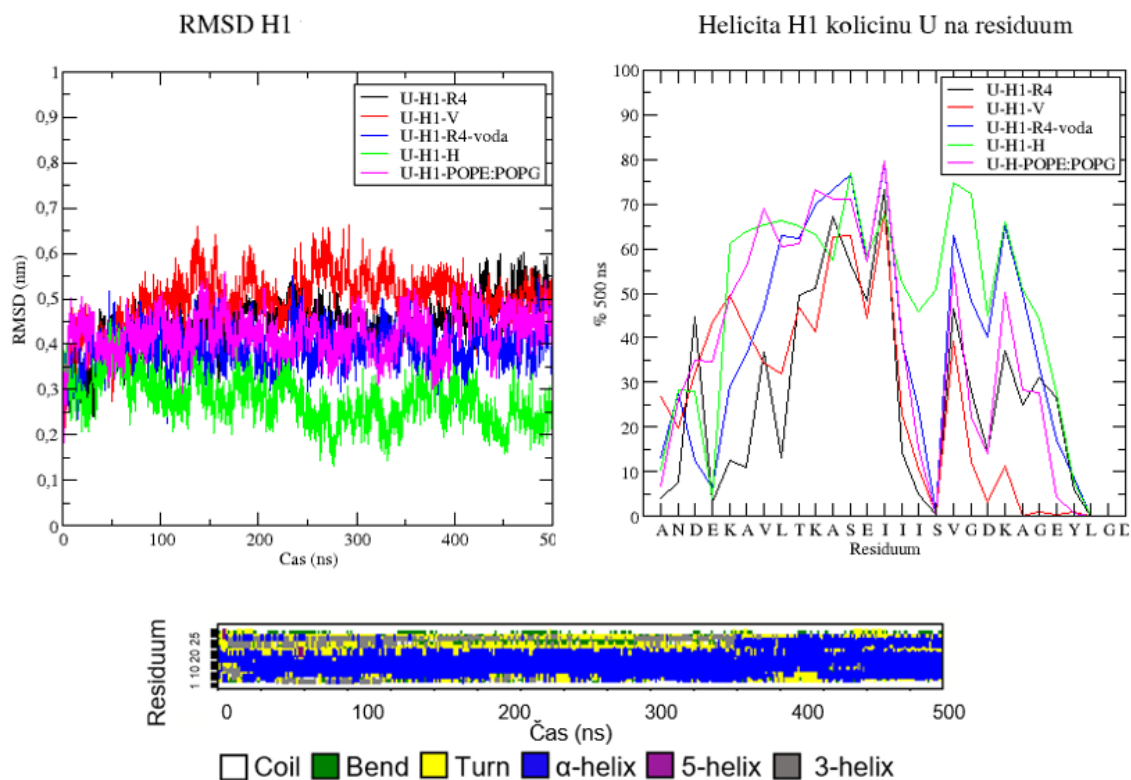
chování H1 v membráně odpovídající lipidovým složením vnitřní membráně *E. coli* při 310 K. Záznam jeho chování je na Obr. 44.

Z VMD snímků je na první pohled patrné, že H1 v této membráně je co do struktury stabilnější. Nicméně i zde se v jeho struktuře tvoří kink a dochází k jemnému atrahování nabitých lipidových hlaviček směrem do středu membrány podél struktury H1. Membránou opět protékala voda.



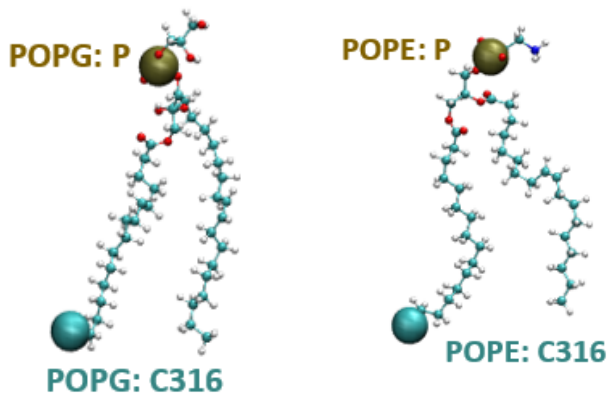
**Obr. 44:** VMD snímky z MD simulace H1 v membráně odpovídající lipidovým složení *E. coli* při 310 K. Barevné značení: Na<sup>+</sup> ionty (zeleně), Cl<sup>-</sup> (žlutě), atomy N (modře), atomy P (zlatě).

Chování H1 v membráně *E. coli* se nejvíce podobalo chování H1-R4-voda systému (viz Obr. 45, graf RMSD). V této membráně však H1 vykazoval mnohem větší helicitu (viz Obr. 45, graf helicity), než v membráně POPC. Jeho helicity struktury odpovídající první části sekvence byla srovnatelná se situací, kdy byl H1 vložen horizontálně do POPC membrány. Membrána, složená z lipidů odpovídajících membráně *E. coli* při 310 K, má stabilizační efekt na strukturu H1. H1 pravděpodobně helikalizuje dříve než v případě membrány POPC. Jeho chování v ní ale jinak významně ovlivněno není. Opět je tvořen kink v SER23 (a ASP26). Náklon, který zaujímá tato struktura v membráně, je obdobný náklonu struktury v POPC. Celkové schéma vývoje sekundární struktury na 500 ns je na Obr. 45.



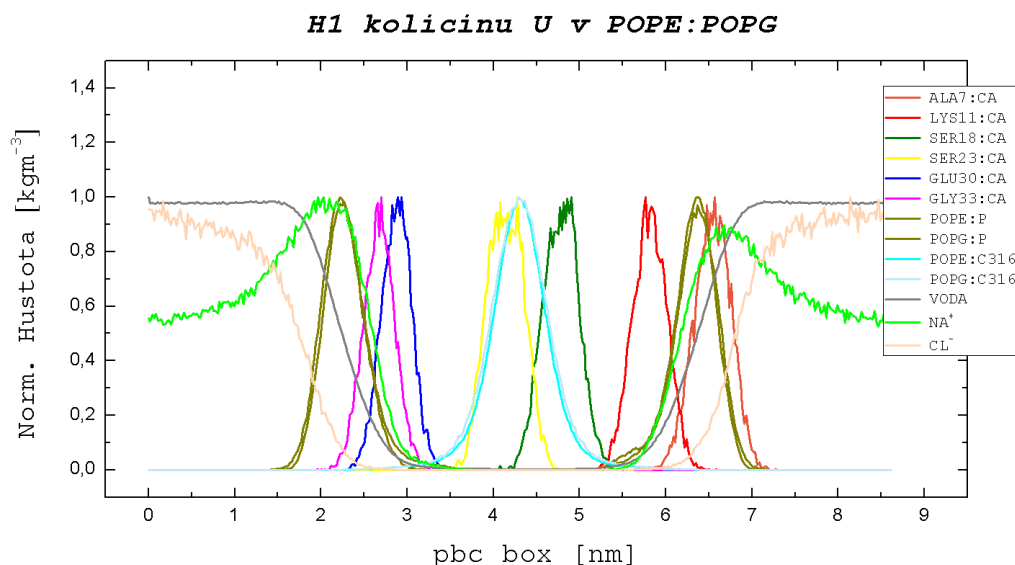
**Obr. 45:** RMSD, helicita H1 v MD simulacích H1 v POPC a v POPE:POPG. Spodní část obrázku zobrazuje vývoj sekundární struktury H1 v membráně *E. coli*. Použitý program byl Grace a DSSP.

Pro analýzu hustotního profilu atomů H1 v umělé membráně *E. coli* při 310 K jsem vybrala atomy C316 zastupující hydrofobní oblast POPE a POPG, a poté atomy P z polární oblasti POPE a POPG membrány. Z H1 peptidu jsem opětovně zvolila C $\alpha$  ALA7, LYS11, SER18, SER23, GLU30, GLY33.



**Obr. 46:** Zvolené atomy POPE a POPG pro analýzu hustotního profilu (VMD).

Z grafu (Obr. 47) vyplývá, že k lokální kumulaci iontů  $\text{Na}^+$  opravdu docházelo u C-konce peptidu H1 i v nabité membráně POPE:POPG. Nicméně jejich průnik do hydrofobní oblasti za GLU30 byl nižšího charakteru než v případě POPC. To je pravděpodobně způsobené přítomností záporně nabitých POPG v membráně. Membrána byla celkově delší než POPC, ale i v tomto případě membránou procházela voda. Anionty chloru se výraznější interakce s peptidem H1 v membráně neúčastnily. Z grafického výnosu hustotního profilu nenormalizovaných dat vyplynulo, že membránou *E. coli* protéká obdobné množství vody jako v případě membrány POPC (není ukázáno).



**Obr. 47:** Analýza hustotního profilu zvolených atomů H1 v POPE:POPG membráně (Origin8).

## 5.5 Srovnání chování H1 kolicinu U a H1 ostatních pórtvorných kolicinů

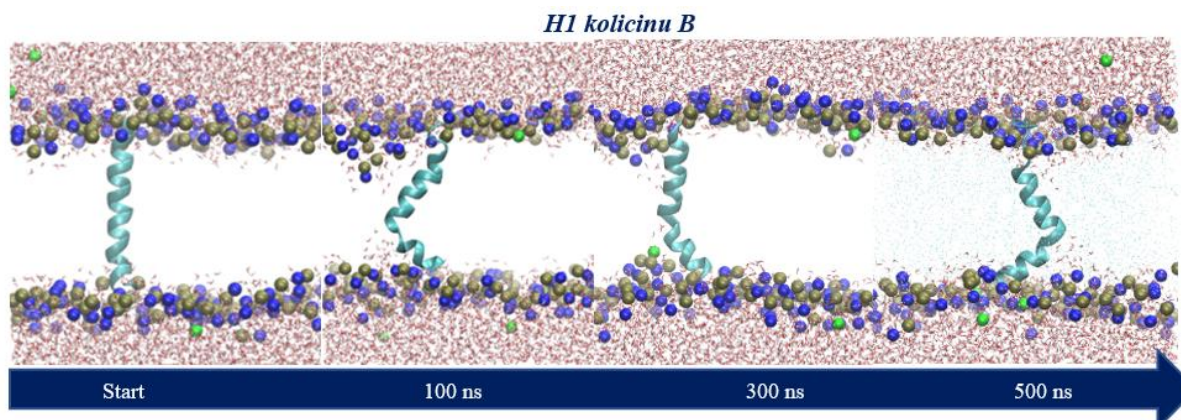
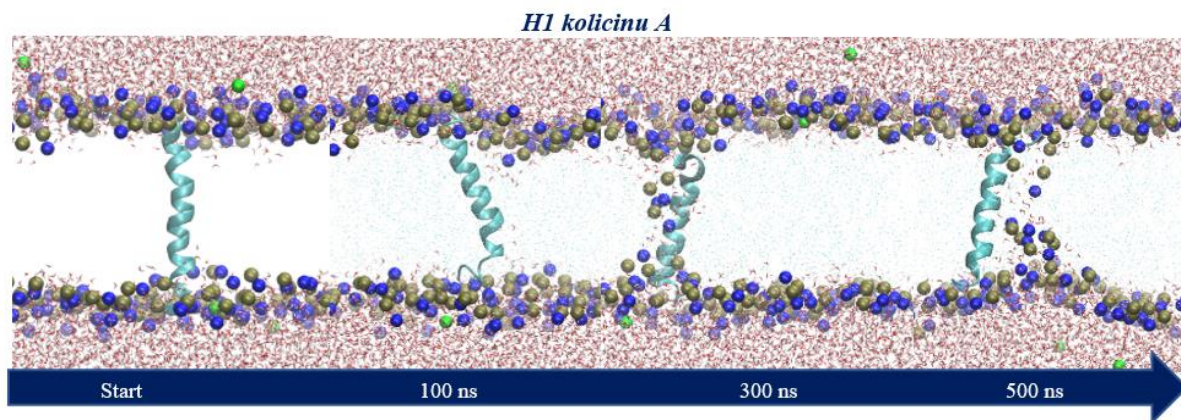
V průběhu své práce jsem se rozhodla prozkoumat chování H1 i ostatních pórtvorných kolicinů, pro které byla již publikována terciární struktura v PDB. Vedla mě k tomu pozorování průběhu trajektorie H1 v membráně ve VMD. Nabyla jsem dojmu, že H1 kolicinu U působí pórtvorně, jenom tento jev nemohu pozorovat na časovém intervalu 500 ns. Zajímalo mě, zda nebude viditelný nějaký efekt pórtvornosti u sekvenčně příbuzného H1. Také mě zajímalo, zda tvorba kinku blízko C-konce peptidu a přitahování iontů  $\text{Na}^+$  k tomuto kinku bude společným rysem i ostatních příbuzných kolicinů, jejichž modely struktur pocházejí z experimentálních dat (i když pro struktury v solubilním stavu). Zajímalo mě, zda budou působit průtok vody membránou



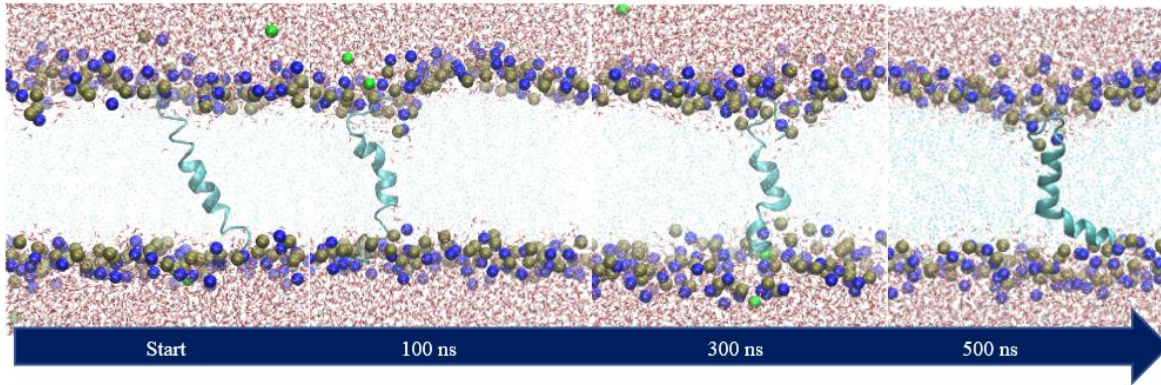
POPC a pokud ano, potom které? Tyto důvody mě vedly ke spuštění MD simulací H1 ostatních PK sekvenčně odpovídající sekvenci H1 kolicinu U zvolené k MD simulaci.

### 5.5.1 VMD snímky z trajektorie H1 ostatních PK v POPC

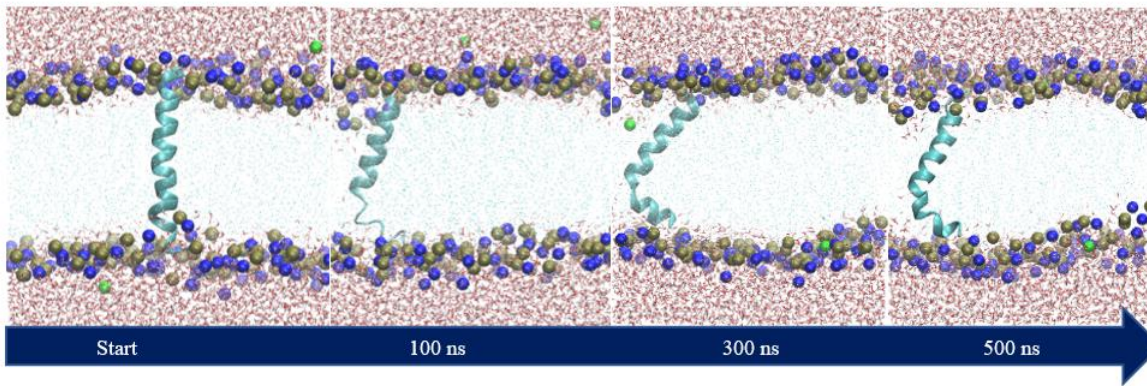
Průběh vypočítané trajektorie H1 PK je znázorněn na snímcích z VMD (Obr. 48). Na první pohled je ze snímků patrné, že všechny H1 PK jsou v POPC membráně helikální. Často se u nich objevuje kink. Zdá se, že je to společná vlastnost. H1 kolicinu A a Ia byl schopný membránu POPC protrhnout. Vlastnosti této struktury či sekvence způsobily atrahování polárních lipidových hlaviček směrem do hydrofobní oblasti membrány. Tím došlo k praktické degradaci funkce lipidové dvojvrstvy. Pro kolicin Ia se tato událost odehrála velmi rychle. Už na 50 ns byly pozorovatelné přesuny POPC hlaviček lipidů. H1 kolicinu A tato událost trvala déle. V 50 ns se i u této struktury vytvořil kink obdobný kinku u H1 kolicinu N, B a U. Nicméně do 100 ns přestal být tak výrazný. K protržení membrány a přitáhnutí lipidových hlaviček do hydrofobní oblasti membrány došlo po cca 200 ns. Chování H1 kolicinu U se nejvíce podobalo chování H1 kolicinu B a N.



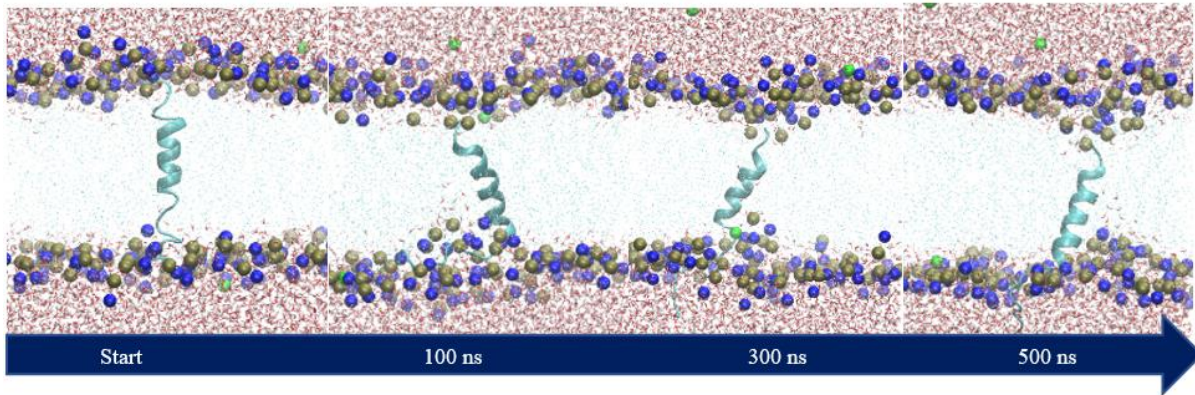
*H1 kolicinu U*

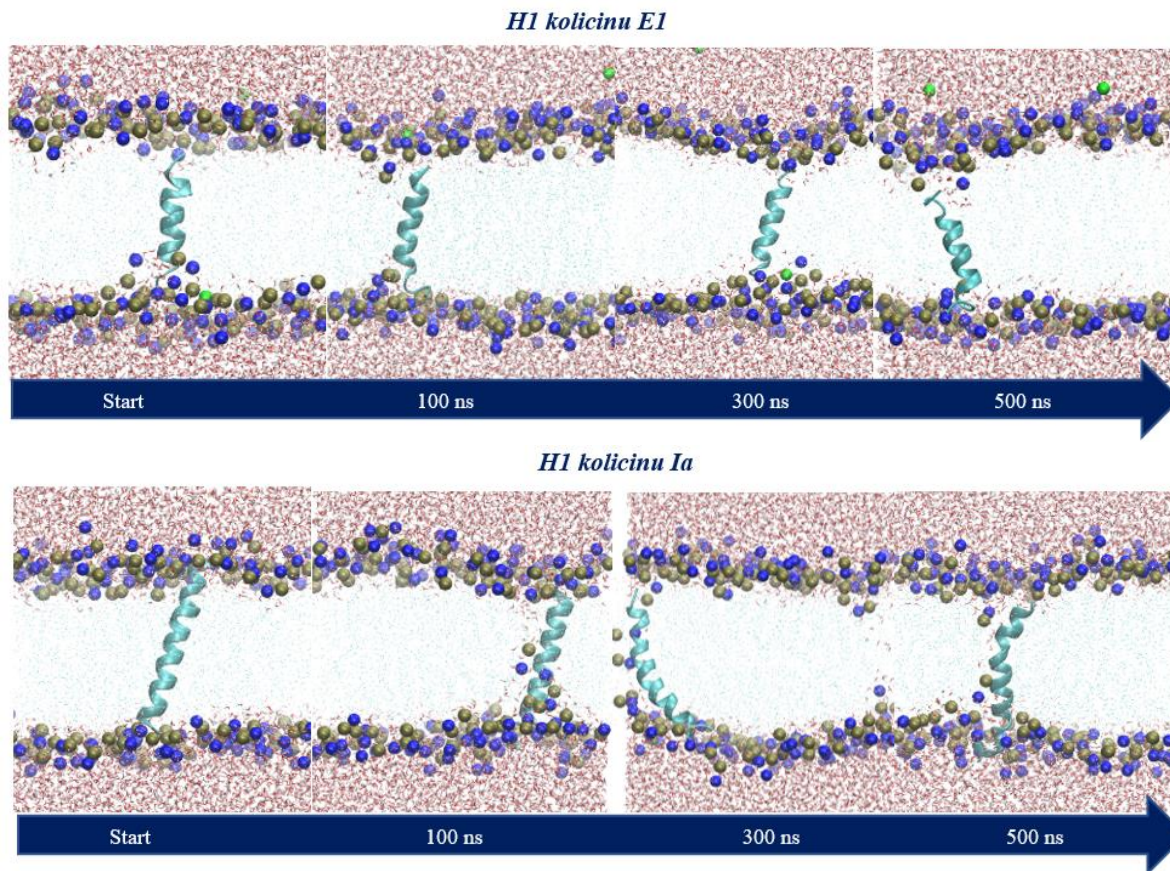


*H1 kolicinu N*



*H1 kolicinu S4*





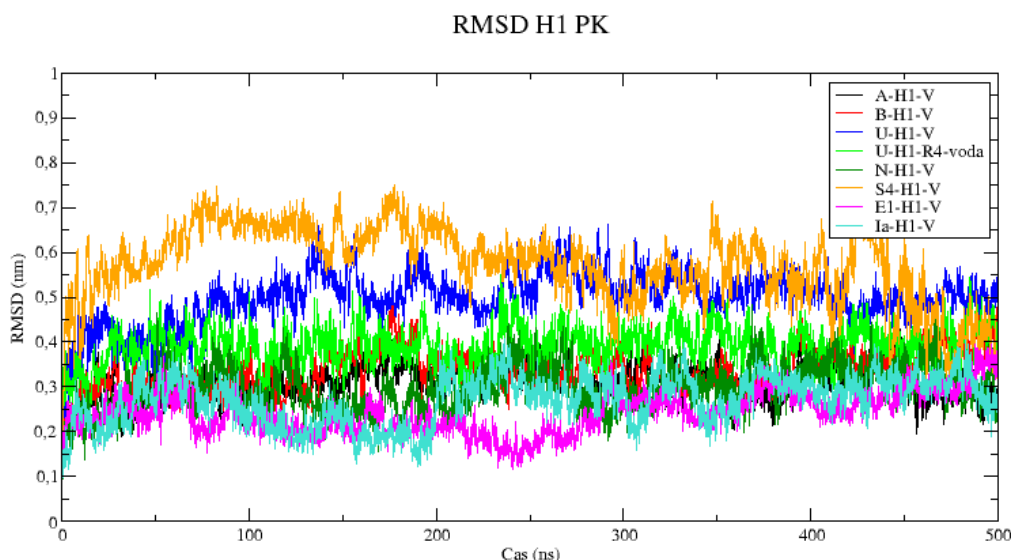
**Obr. 48:** VMD snímky v 0, 100, 300 a 500 ns MD simulace peptidu H1 PK v membráně POPC a protiionty  $\text{Na}^+$ . Barevné značení a styl zobrazení: Atomy P molekul POPC (zlatě, VDW), atomy N POPC (modře, VDW), ionty  $\text{Na}^+$  (zeleně, VDW), molekuly vody (červeně, Bonds s menším vazebným poloměrem (0,1), ostatní atomy POPC (tyrkysově, Points), peptid (tyrkysově, NewCartoon).

### 5.5.2 RMSD H1 ostatních PK v POPC membráně

Z grafu pro RMSD (Obr. 49) vyplývá, že v průběhu MD simulace se nejvíce strukturně změnil H1 kolicinu S4. Došlo k rozvolnění jeho helikální struktury poblíž C-konce. To mohlo být částečně způsobeno tím, jak jsem ho vložila do membrány. Byl vložen C-koncem o trochu více níže než v případě ostatních H1 kolicinů. Jeho RMSD v čase klesala a dostala se až na úroveň hodnoty systému U-H1-R4-voda. Peptid postupně nabýval helikální struktury a strukturně se začínal stabilizovat.

Nejvíce rovnovážně se chovala struktura H1 kolicinu A, B a N. Koliciny A, B a N jsou nejvíce příbuzné kolicinu U, přičemž kolicin B je mu sekvenčně nejvíce podobný. Z grafu níže je

také vidět, že RMSD helixu H1 kolicinu U a S4 se od 300 ns začínaly překrývat. Kolicin E1 a Ia měly nejmenší hodnotu RMSD. E1 měl ale poměrně krátkou sekvenci ve srovnání s ostatními H1. Pro H1 kolicinu Ia je patrný na 200 ns skok ve křivce RMSD. V tomto čase došlo k mírnému posunu této struktury do nižší vrstvy membrány. To by mohlo odpovídat experimentálním výsledkům, z nichž se předpokládá, že by H1 samostatně CTD kolicinu Ia mohl prostupovat jednak napříč membránou a tvořit pór, a jednak by mohl být z membrány vysunut na trans stranu a více se tvorby póru neúčastnit. V této MD simulaci byl náznak tohoto posunu pozorován. Nedá se však určit, zda by k němu skutečně došlo, neboť můj H1 obsahoval nepřírozený C-terminální konec. Ovšem stejně jako v případě studia separátní CTD Ia, obsahoval N-konec, který byl použit i k jejich měření.



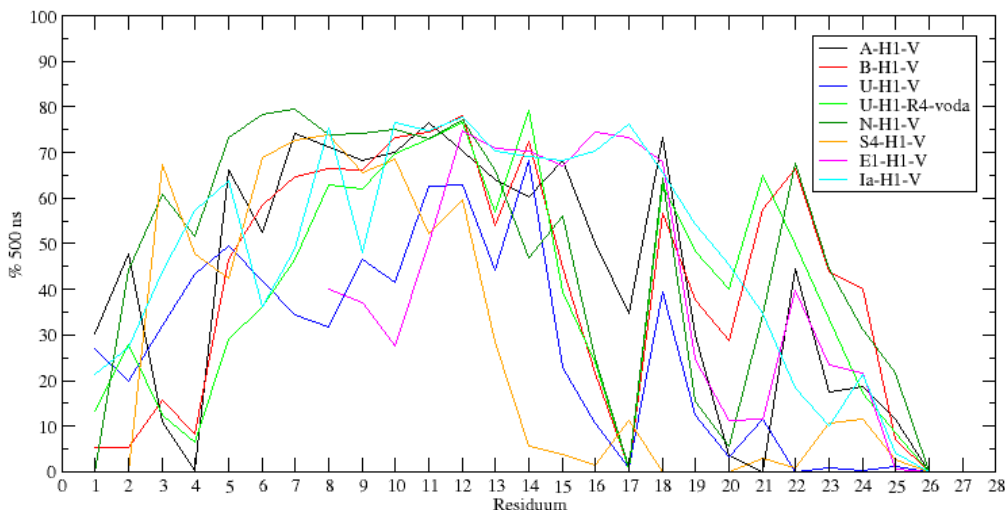
**Obr. 49:** Porovnání RMSD jednotlivých H1 pórtvorných kolicinů. H1 byly vloženy stejným způsobem do POPC membrány vertikálně. V legendě je uveden kolicin, ze kterého struktura H1 pochází a V značí její vertikální orientaci v membráně. Graf byl vygenerován programem Grace.

### 5.5.3 Helicita H1 ostatních PK v POPC membráně

Z grafu (Obr. 50) porovnání analýzy helicity H1 publikovaných CTD PK vyplývá, že všechny H1 obsahují část sekvence (residuum 5 až 13, číslováno od 1), která je vždy minimálně z 25 % helikální. Výjimkou je H1 kolicinu E1, jehož první část struktury chybí. Peptidy H1 kolicinu B, U, N jsou si chováním velmi podobné, obsahující residuum v pozici 17 (pro kolicin U

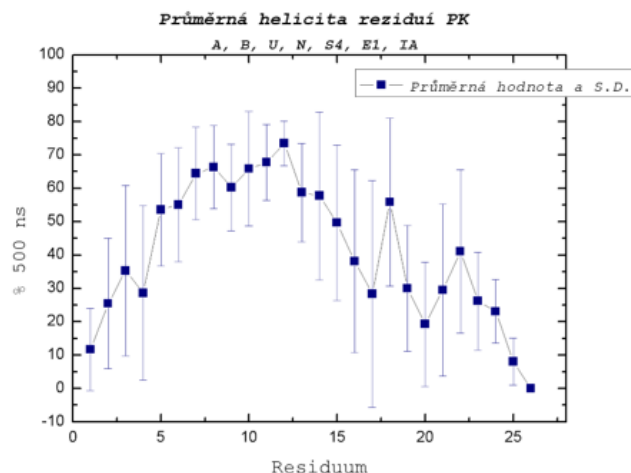
se jedná o SER23), které není na celém časovém intervalu MD simulace nikdy helikální. H1 kolicinu Ia A E1 jsou si podobny v tom, že mají na pozici 17 i částečně helikální residuum. Kolicin A měl toto residuum helikální jen ve 37 % 500 ns. Chování S4 se odlišuje, ale to je pravděpodobně způsobené tím, že se jeho struktura odpovídající blízké části C-konce během simulace rozvolnila.

Helicita H1 PK na residuum

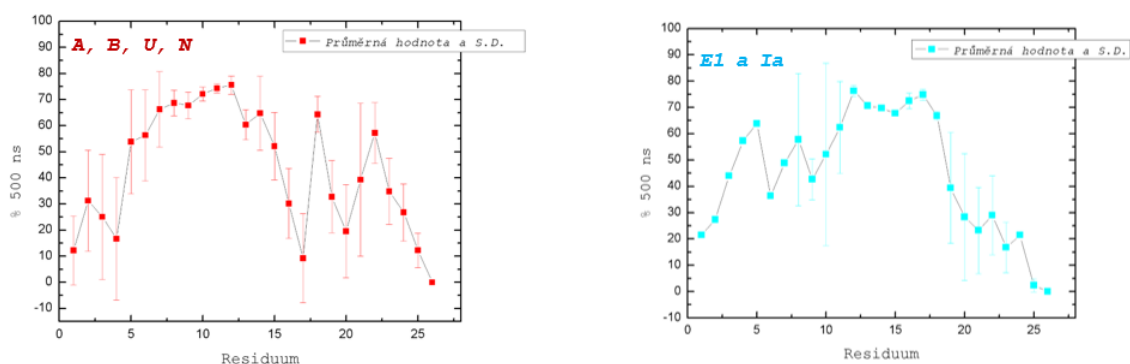


**Obr. 50:** Porovnání helicity na konkrétní residuum pórtočných kolicinů. Všechny H1 PK byly vloženy stejným způsobem do POPC membrány vertikálně. V legendě grafu je uveden kolicin, ze kterého struktura H1 pochází, a V značí jeho vertikální orientaci v membráně. Graf byl vygenerován programem Grace.

Z výnosu průměrné helicity jednotlivých AMK zbytků H1 všech pórtočných kolicinů (Obr. 51) je největší variabilita pro residuum 17, pro oblast kinku. Z toho důvodu jsem rozdělila H1 kolicinů na skupinu a) A, B, U (U-H1-R4-voda) a N (Obr. 52) a b) E1 a Ia (Obr. 52). H1 S4 (a H1 U-V) jsem do grafů nezahrnovala, jelikož jeho chování bylo ze začátku simulace nerovnovážné a výrazněji se odlišovalo i v helicitě. V případě skupiny a) je největší shodnost pro helicitu u residua 8-13. Jedná se tak pravděpodobně o část sekvence, která bude strukturně tvořit jádro helixu H1. Tedy residua, která jsou spíše blíže N-konci peptidu H1. V případě skupiny b) se jedná o residuum 12-18 (první část sekvence E1 odpovídající délce sekvence H1 ostatních PK nebyla k dispozici). Tyto struktury netvoří kink v pozici 17, ale v jiné.



**Obr. 51:** Průměrná helicity na residuum napříč pórtovnými koliciny (Origin8).

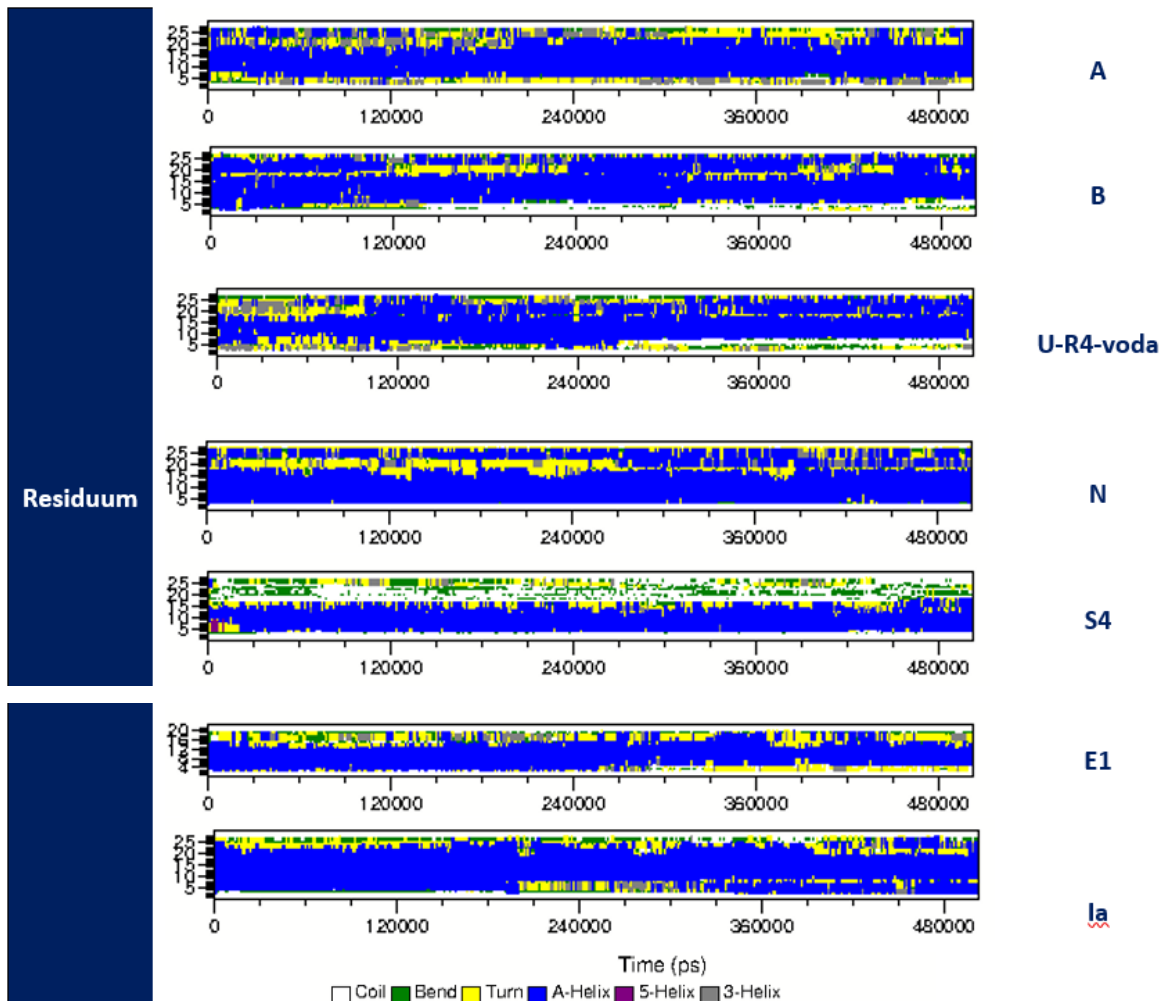


**Obr. 52:** Průměrná helicity na residuum napříč H1 kolicinu A, B, U, N (vlevo) a E1 a Ia (vpravo).

Grafy byly získány programem Origin8

### 5.5.4 Sekundární struktura H1 ostatních PK v POPC membráně

Z porovnání sekundárních struktur uvedených na Obr. 53 vyplývá, že všechny H1 publikovaných CTD PK se v MD simulace chovají, co se týče helicity, relativně rovnovážně. Všechny obsahují alespoň v nějaké části simulace turn kolem oblasti residua 20. V případě S4 došlo ale k částečnému rozvolnění helikální struktury právě v oblasti za výše uvedeným turnem. Chováním jsou si nejvíce podobny helixy B, U-R4 s vodou v jeho blízkosti při startu MD simulace, a helix N.

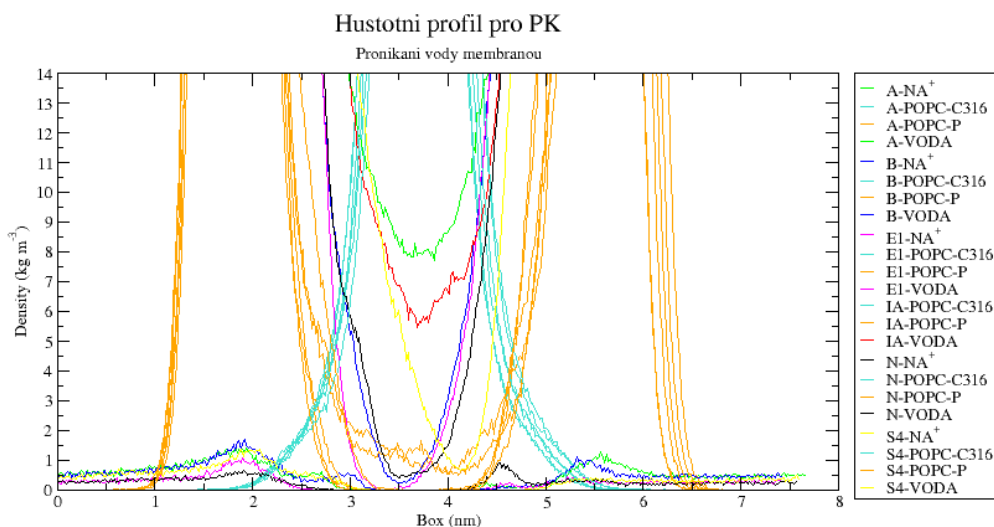


**Obr. 53:** Porovnání sekundárních struktur peptidů H1 PK, které byly vloženy ve vertikální orientaci do POPC membrány. V pravém sloupci je uveden kolicin, ze kterého struktura H1 pochází. Obr. byl vygenerován v Gromacsu analýzou DSSP.

### 5.5.5 Hustotní profil průniku vody do membrány POPC způsobený PK

Z grafu Obr. 54 je jednak patrné, jak moc voda pronikala do hydrofobní oblasti membrány POPC vzhledem k použitému H1 kolicinu, a jednak že dochází k posuvům ve struktuře membrány u N-konce peptidu. Nejvíce membránu rozrušil H1 kolicinu A (zeleně). Stejnou barvou jsou označeny protiionty  $\text{Na}^+$ . H1 kolicinu A a Ia způsobil natažení lipidových hlaviček do hydrofobní oblasti membrány (v grafu zaznamenáno oranžovými spodními křivkami nad hodnotou 3 až 4,3 osy x). H1 kolicinu Ia v porovnání s H1 kolicinem A byl méně účinný. Na grafu je také zachyceno zvláštní ovlivnění průchodu vody membránou v případě H1 kolicinu S4. Jednalo se o

velmi šikmý průchod napříč membránou. Celá monovrstva membrány u jeho C-konce byla strukturně také ovlivněna. H1 kolicinu B, N, (a U, které zde není zobrazeno) způsoboval průchod vody membránou v podobném množství. Nejméně vody membránou protékalo v případě H1 kolicinu E1 (růžově). To mohlo být ale způsobeno tím, že helix H1 kolicinu E1 je velmi krátký, tj. jeho publikovaná struktura neobsahuje sekvenci, kterou já v případě H1 ostatních kolicinů v MD simulaci používám. Všechny H1 pórotvorných kolicinů, pro které byla publikována struktura, také způsobovaly lokální kumulaci protiiontů na C-konci peptidu. Od tohoto trendu se odlišuje pouze H1 kolicinu N (černě), kde byly  $\text{Na}^+$  ionty atrahovány k jeho struktuře i poblíž jeho N-konce.



**Obr. 54:** Hustotní profil pro průnik vody membránou způsobený H1 ostatních PK. Vynesena jsou nenormalizovaná data. Graf byl získán programem Grace.

### 5.5.6 Základní vlastností H1 ostatních PK v membráně POPC

Shrnutí základních vlastností H1 PK je uvedeno v Tab. 12. Všechny H1 jsou transmembránové helixy s kinkem, kromě kolicinu Ia. H1 kolicinu A tvořil kink jen cca prvních 70 ns MD simulace. Všechny způsobují průnik vody membránou a akumulaci  $\text{Na}^+$  iontů poblíž kinku jejich C-konce. Všechny vykazovaly nižší RMSD a vyšší helicitu při analogickém postupu přípravy peptidu H1 v POPC membráně. Po těchto analýzách jsem se nadále rozhodla model R-4 k dalšímu studiu nepoužívat. Získala jsem totiž teoretický model M-1 pro CTD v solubním stavu a dále jsem využívala ten. Výjimkou byla pouze MD simulace chování segmentu CTD kolicinu U obsahující helix H1 a H2, která byly primárně určena na sledování chování H2.

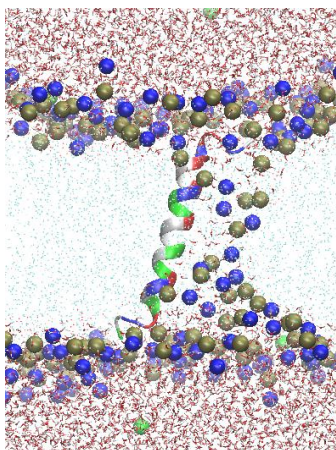


Srovnání vertikálních helixů H1 PK v POPC membráně							
kolicin	U	A	B	N	Ia	S4	E1
lokazace	HM	HM	HM	HM	HM	HM	HM
orientace	V+kink	V(kink)	V+kink	V+kink	V	V+kink	V+kink
helicita	A+	A±	A+	A+	A±	A+	A+
průtok vody	A	AP	A	A	AP	A	A

**Tab. 12:** Shrnutí vlastností peptidů H1 PK, které byly vloženy ve vertikální orientaci do POPC membrány. Vysvětlivky: lokalizace HM= POPC hlavičky i řetězce MK. Orientace V = vertikální. Helicita A = ano, + = helicitu získává, ± = helicitu získává i ztrácí. Průtok vody napříč membránou A = ano, AP = silné porušení membrány.

### 5.5.7 Identifikace AMK zbytků H1 uplatňujících se v atrakci POPC hlaviček do středu lipidové membrány

Pro identifikaci residuí, která se účastní v atrahování nabitých POPC hlaviček směrem do membrány byly nejprve vyneseny helikální projekce pro H1 každého kolicinu (není ukázáno). Z nich bylo patrné, že H1 z jedné své strany obsahuje nabitá residua, která jsou schopná alespoň v případě kolicinu A a Ia interagovat s POPC hlavičkami membrány (Obr. 55).



**Obr. 55:** Interakce helixu H1 kolicinu A s lipidovou membránou POPC a tvorba toroidního zakřivení. Snímek pochází z VMD, barevně jsou označena kladná (modře), záporná (červeně), polární + GLY (zeleně) residua. Nepochárny AMK jsou zobrazeny bílou barvou. Modrá barva odpovídá atomům N molekul POPC a zlatá barva pak atomům P molekul POPC.

### 5.5.7.1 Hustotní profil pro Ca PK v membráně POPC

H1 kolicinu A a Ia působil pórotvorně, pokud byla jeho část (z N-konce) hlouběji v membráně ve srovnání s ostatními studovanými H1 PK. Záznam o tomto posunu je v hustotním profilu zvolených Ca PK (Obr. 56). Konkrétní pozice zvolených residuí pro hustotní profily v rámci zvolených sekvencí je v Tab. 13.

CTD	Zvolené Ca H1 PK pro analýzu hustotního profilu				
	Sekvence H1	Struktura	Resid	$q$	n AMK
A	KAKD ERELLEKTSE LIAQMGDKIG EHLGD KYKAI	1COL:A	5-32	-4	28
B	QEND EKTVLTKTSE VIIQVGDKVG EYLGDKYKAL	1RH1:A	315-342	-4	28
U	KAND EKAVLTKASE IIIQVGDKAG EYLGDKYKVL	R-4	7-34	-3	28
N	KEKN EKEALLKASE LVSQMGDKLG EYLGDKYKQNV	1A87:A	189-216	-2	28
S4	RDRI QSDVNLKAAE VISQIGNKVG DYLGDAYKSL	3FEW:X	300-327	-3	28
E1	QNNL LNSQIKDAVD ATVSFYQTLT EKYGEKYSKM	2I88:A	345-365	-2	21
Ia	RKQD ELKATKDAIN FTTQFLKSVS EKYGA KAEQL	1CII:A	442-469	0	28

**Tab. 13:** Sekvence simulovaných H1 PK jsou zvýrazněny světle modrou barvou. Barevné kódování daných AMK zbytků odpovídá barvě residua v grafickém výnosu hustotního profilu.

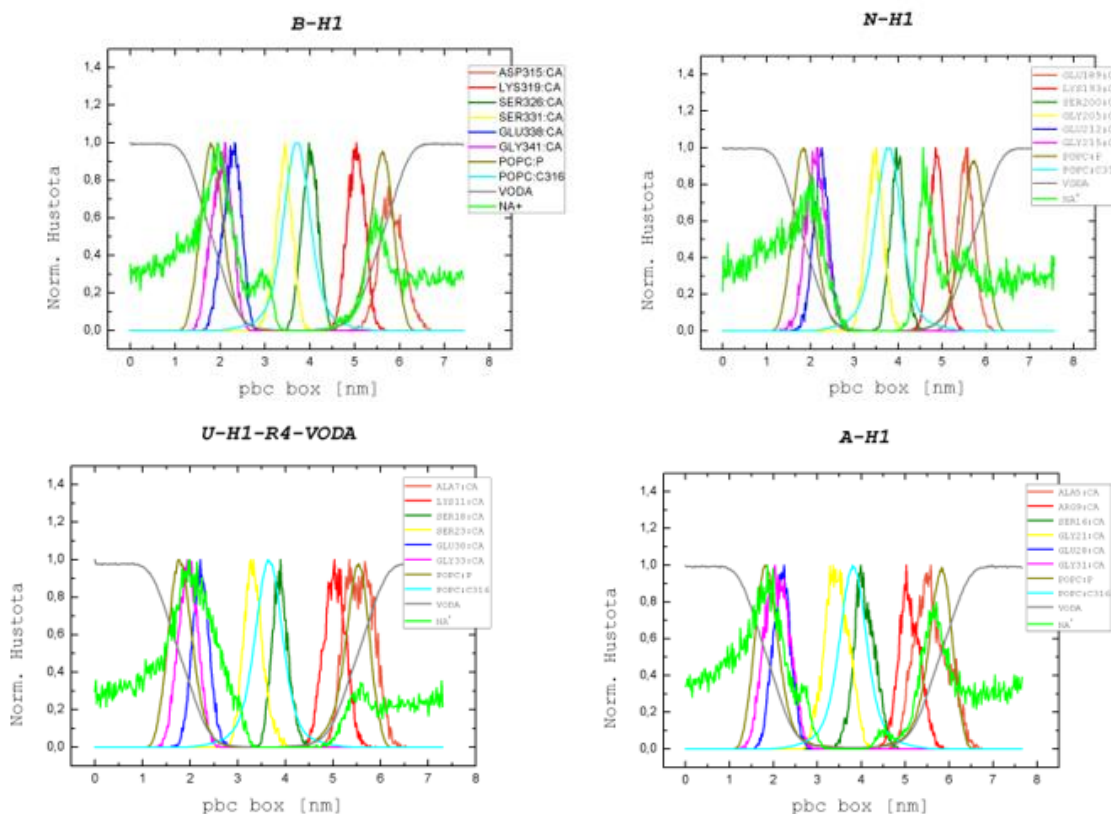
V natažení lipidových hlaviček do membrány z N-koncové strany peptidu H1 kolicinu A (resp. Ia) se uplatňuje druhé (resp. první) residuum jeho zvolené sekvence k MD simulaci. Tzn. LYS. Poté opět další ARG a LYS v pořadí.

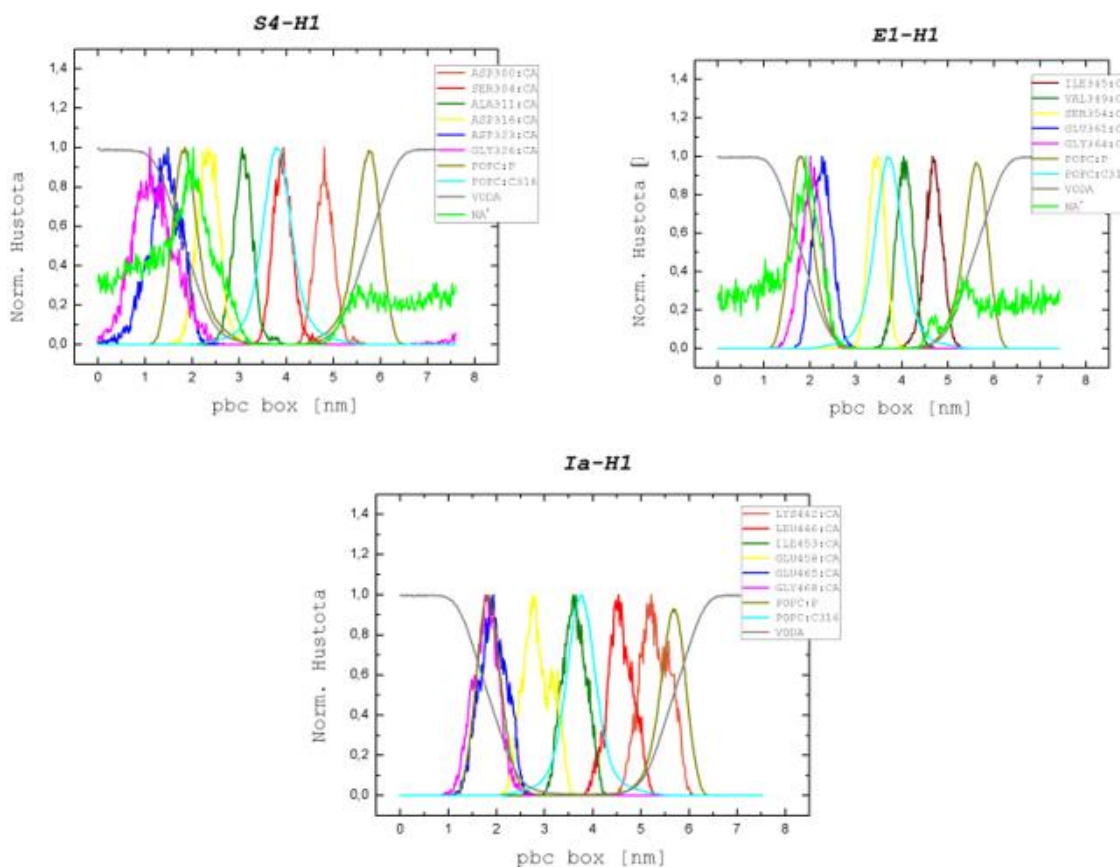
Nejvíce příbuzná CTD kolicinu A je CTD kolicinu S4. Důvod, proč nedošlo k většímu přitahování POPC hlaviček ke středu membrány z N-konce H1 kolicinu S4, je pravděpodobně v SER304 (červeně). Kdyby byl v této pozici LYS nebo ARG, pravděpodobně by došlo v 500ns intervalu MD simulace k propojení obou monovrstev membrány skrze lipidové hlavičky. Tento předpoklad pro H1 kolicinu S4 ověřím v MD simulaci pomocí mutagenese jeho SER304 za LYS304 ve své další práci. Střední část peptidu S4, která byla lokalizovaná vprostřed hydrofobní oblasti membrány od jeho C-konce polární hlavičky přitahovala velmi silně. Tento jev je vidět i na lokalizaci protiiontů Na<sup>+</sup> v MD simulaci. Ty byly přitahovány do středu membrány také velmi silně. Z C-konce peptidu H1 je za to pravděpodobně zodpovědné první kladně nabitě residuum za AMK zbytkem odpovídající sekvenčně SER23 (kink, žlutě) kolicinu U. Aby mohlo dojít ke kompletnímu přehrazení membrány POPC hlavičkami, tak je dále nutné umístění prostředního LYS helikálního jádra sekvence H1 před „(zeleným) SER18 kolicinu U“ a GLU za „(zeleným) SER18 kolicinu U“ do optimální vzdálenosti membrány. Konkrétní residua nejsou v této práci vypsána, neboť předpokládáme jejich použití do vědecké publikace.

Toto tvrzení je podloženo pozorováním z MD simulace, ve které došlo ke změně pozice H1 kolicinu A v membráně. V prvních cca 70 ns simulace H1 kolicinu A tvořil kink a do cca 200 ns byla jeho N-koncová část v kontaktu s vodnou fází membrány. Poté ale došlo v membráně k jeho posunu ve směru osy -z. H1 kolicinu Ia změnil pozici téměř ihned po vložení do POPC membrány. Tento jev ještě ověřím sadou několika dalších MD simulací ve své další práci.

Z grafů hustotního profilu (Obr. 56) je také vidět, že protiiony  $\text{Na}^+$  prostořovaly z C-strany H1 hlouběji do membrány pro kolicin A, B, U, S4. Kolicin Ia byl elektroneutrální, proto do MD simulace protiiony přidány nebyly. Nicméně v budoucnu plánuji provést MD simulace těchto peptidů v roztoku o koncentraci soli odpovídající experimentálním podmínkám měření na BLM.

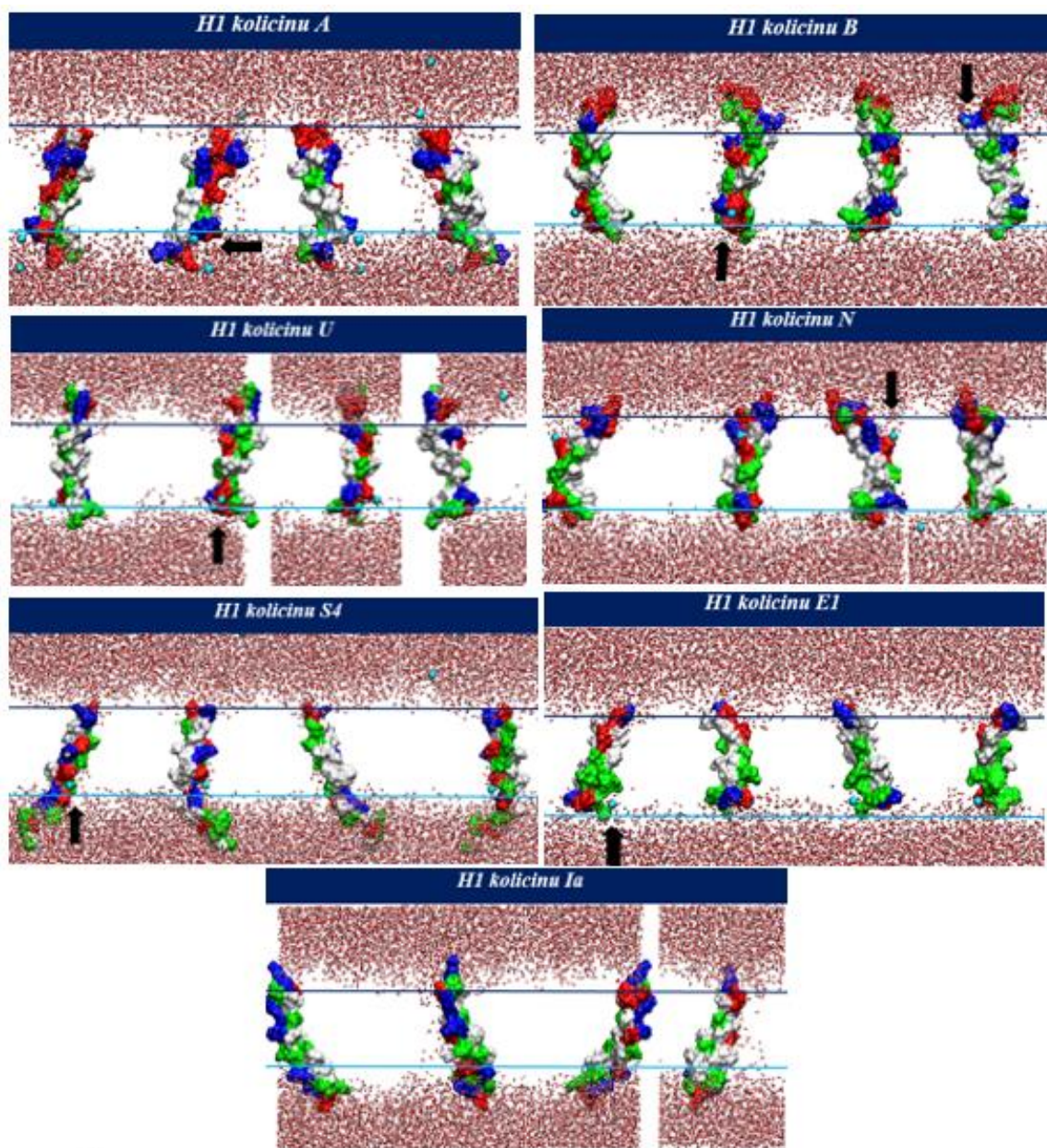
Z těchto grafických záznamů je dále vidět, že protiiony  $\text{Na}^+$  mají na H1 peptidech svá interakční místa, kde se s určitou pravděpodobností vyskytují. To by mohlo vysvětlovat experimentálně pozorovanou iontovou selektivitu kolicinů a stejně tak vliv pH na pórtvornou aktivitu daného druhu kolicinu, nebo také vliv  $\text{Ca}^{2+}$  iontů na stabilizaci kolicinového kanálu. Z těchto grafů je totiž patrné, že i N-koncová část některých peptidů H1 tato specifická místa obsahuje (kolicin A, N). To by mohlo vysvětlovat drobné rozdíly v chování kanálů pozorovaného např. na BLM.





**Obr. 56:** Záznam z analýzy hustotního profilu pro zvolené Cα H1 kolicinů U, A, B, N, S4, E1 a Ia. Data osy y byla normalizována podle maxima. Grafy byly získány programem Origin8.

Následující snímky z VMD pro jednotlivé H1 v POPC membráně v čase 300 ns MD simulace (Obr. 57) doplňují předchozí grafy hustotních profilů. Tento čas byl vybrán proto, že v něm bylo nejvíce patrné přitahování  $\text{Na}^+$  iontů k jejich vazebným místům na H1. Zobrazeny jsou ve VMD všechny čtyři strany peptidu H1 pomocí metody Surf s možností ResType. Protiionty jsou barevně kódovány tyrkysovou barvou.



**Obr. 57:** Vazebná místa pro ionty  $\text{Na}^+$  na peptidech H1. Barevné značení (VMD): Peptid (Surf, ResType): nepolární AMK bíle, polární AMK a GLY zeleně, modře kladně nabitě AMK, červeně záporně nabitě AMK. Molekuly vody zobrazeny červeně (Bonds). Atomy POPC nejsou zobrazeny.

Dále si myslím, že by se ve funkci helixu H1 na membránu mohlo uplatňovat ještě první residuum z N-konce helixů H1, které však nebylo k MD simulaci zvoleno. Jedná se většinou o konzervovaný LYS, ARG či GLN. (Konkrétní residua zde uvedena nejsou, jelikož je plánujeme použít pro vědeckou publikaci). Pokud by se i tato residua uplatňovala v protržení lipidové dvojvrstvy, tak by to pět podporovalo experimentální závislosti aktivit těchto kolicinů na pH a rozdílné iontové selektivity. Pokud by bylo pH nižší, tento segment obsahující H1 by se pravděpodobně snáze zabudoval samovolně do membrány, snáze by termodynamicky prošel skrz polární část membrány směrem do hydrofobní oblasti. Důležitost těchto residuí budu dále ověřovat ve své další práci – jednak jejich mutagenezí za jinou AMK v MD simulaci a také se zaměřím na studium protonačních stavů těchto peptidů.

Mírnou iontovou selektivitu kolicinů by potom bylo možné vysvětlit tím, že se v určitých helixech vyskytují specifická iontová interakční místa. Resp. existence těchto specifických vazebných míst pro ionty, indikuje, že iontová selektivita je možná. Z grafů hustotního profilu je patrné, že ionty  $\text{Na}^+$  vazebná místa na peptidu H1 mají. Ve své další práci tedy ověřím specifčnost vazby i pro ostatní ionty používané k experimentálnímu studiu (např. na BLM). Konkrétní residua nejsou v této práci vypsána, neboť předpokládáme jejich použití do vědecké publikace.

Z pozorovaného chování (Obr. 57, výše) jsem si také uvědomila možnost, že jsem možná zvolila příliš dlouhou sekvenci H1 peptidu pro MD simulaci. Velká část z C-konce peptidů, které projevily v MD simulaci pórotvorné chování, totiž vůbec nakonec nebyly v hydrofobní oblasti membrány. Mohla to být již delší část helixu H2. Z MD simulací chování helixu H2 kolicinu U jsem nepředpokládala, že by membránou mohl tento helix procházet napříč, neboť jeho sekvence obsahuje příliš málo AMK. H2 by mohl procházet transmembránově společně s H1 za předpokladu, že by byla lipidová membrána „ztenčena“. V MD simulacích jsem tento jev u některých helixů kolicinu U pozorovala.

## 5.6 Chemická syntéza helixu H1 CTD kolicinu U a jeho purifikace

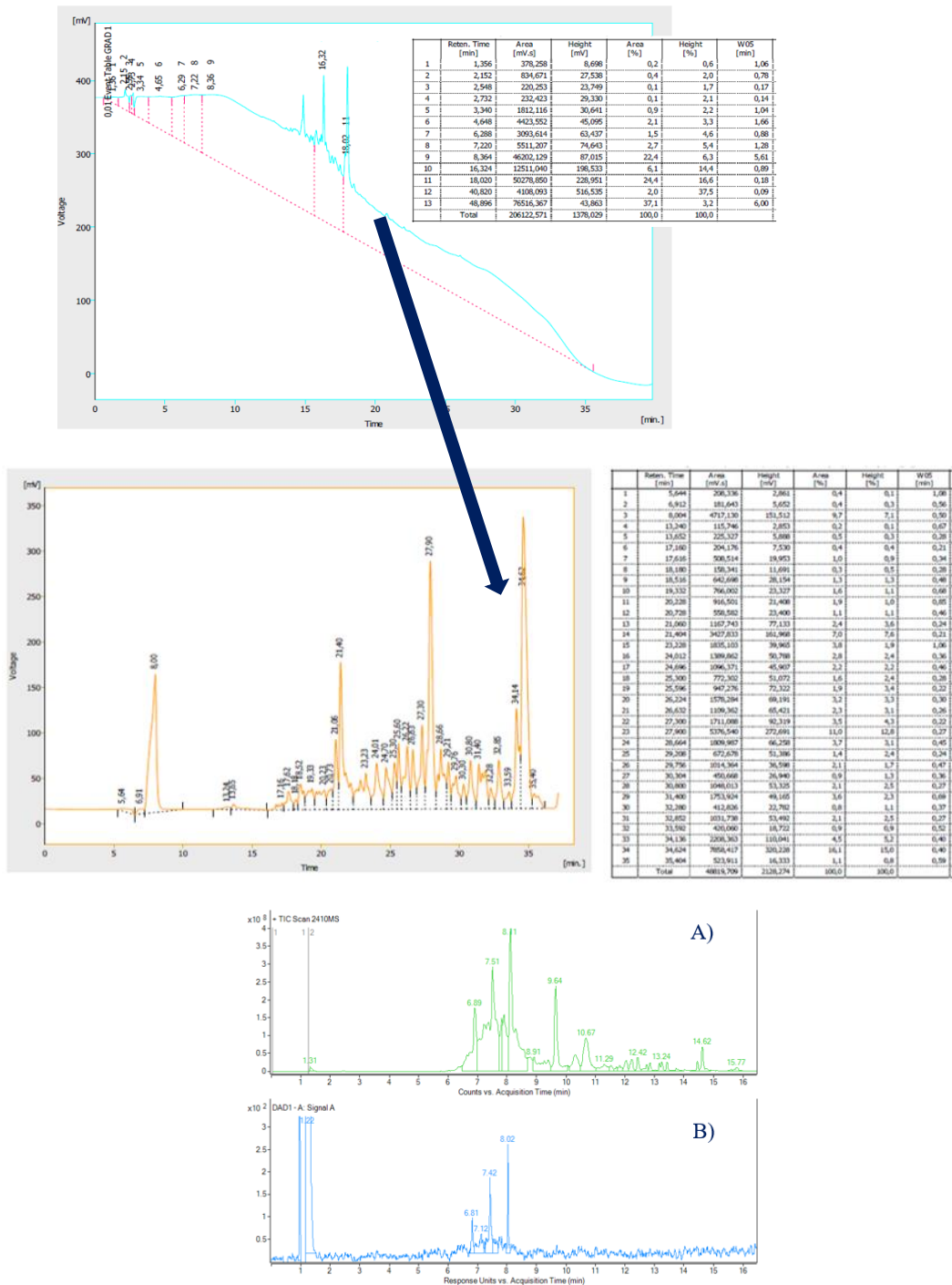
Dalším cílem mé práce bylo ověřit předpoklad, že H1 kolicinu U je schopný vykazovat pórotvornou aktivitu, kterou jsem v MD simulaci pozorovala alespoň pro H1 kolicinu A a Ia v POPC membráně. K tomu, abych mohla zkoumat chování peptidu H1 kolicinu U pomocí metody BLM, ho bylo třeba nejprve připravit. K tomu jsme zvolili chemickou syntézu, která mi byla nabídnuta v rámci dohody mého školitele se skupinou Dr. Pavla Majera z ÚOCHB AV ČR.

Chemickou syntézou a postupem uvedeným v kapitole metody syntézy, se mi podařilo připravit hmotu odpovídající potenciálně surovému peptidu H1 kolicinu U pomocí automatického syntetizátoru. Následně bylo třeba tuto hmotu analyzovat pomocí analytické HPLC kolony. V této koloně dochází k separaci látek, které jsou detekovány dvěma detektory: A) první je UV detektor měřící UV absorpci látek, B) druhý pak TIC (Total Ion Current), poskytující TIC chromatogram, ve kterém je zobrazena molekulová hmotnost jednotlivých látek.

První záznamy poskytují informaci o tom, že v určitém čase dopadly dané ionty. Tzn. došlo k rozdělení látky na koloně a v konkrétním čase tato látka doputovala do MS. Z MS záznamu této analýzy (Obr. 58) pro surový H1 jsou viditelná tři hlavní maxima, která odpovídají UV záznamu.

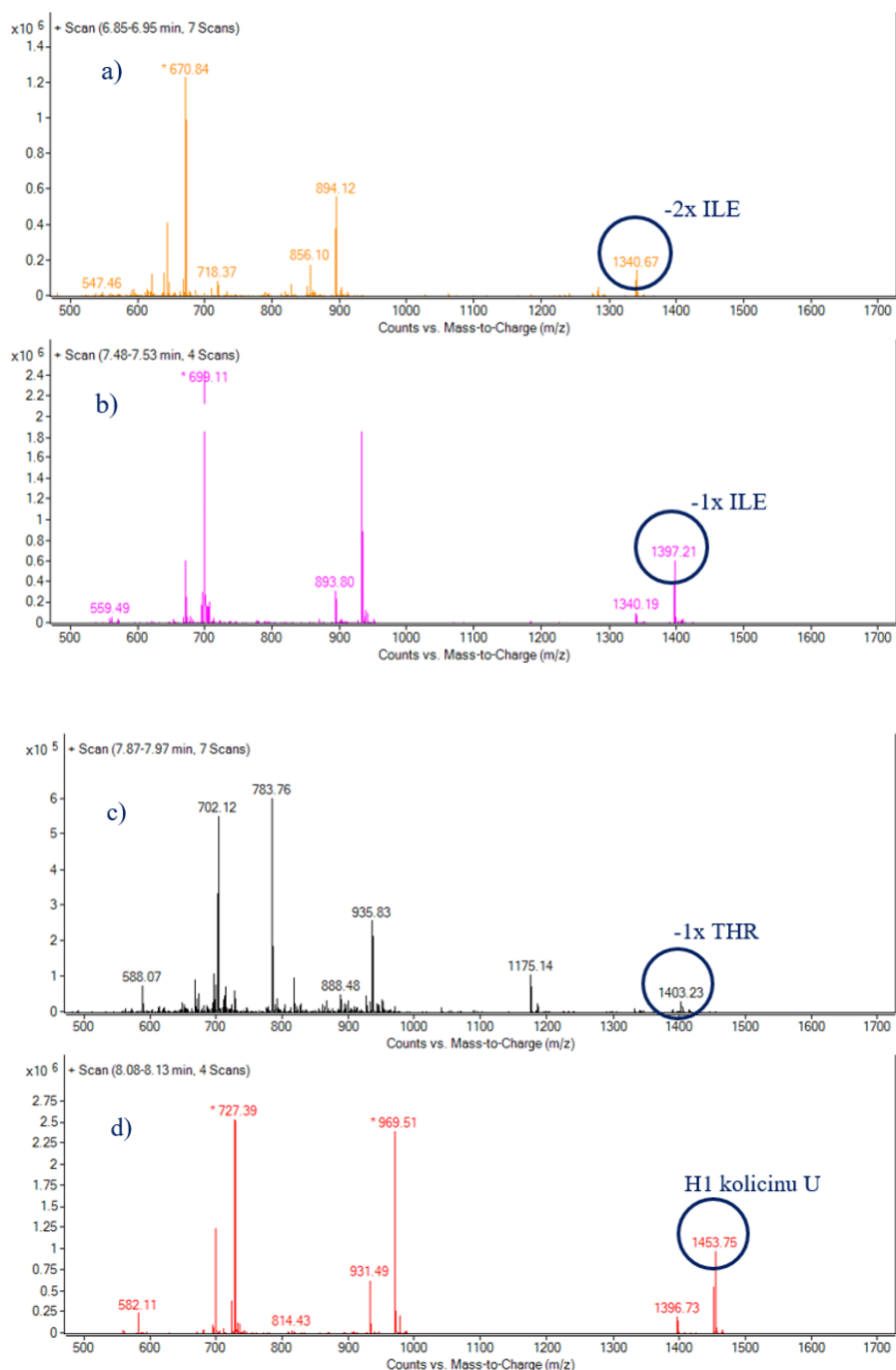
Sekvence H1 měla mít po vypočítání celkovou molekulovou váhu **2904 g/mol**. První maximum odpovídalo hmotě o molekulové hmotnosti 1340 m/z (Obr. 59 a). Tato hmota byla dvakrát nabitá a po odečtení dalších 2 nábojů, které náleží 2 vodíkům byla její celková váha 2678 g/mol.  $[(1340 \cdot 2) - 2] = 2678$ . Tato molekulová váha však neodpovídala celkové vypočtené hmotnosti peptidu H1. V hmotě o molekulové váze 1340 m/z chybí 2x ILE. Jedna molekula ILE má molekulovou hmotnost 113 g/mol. Tedy  $[(2 \cdot 113) + 2678] = 2904$ . Důvod, proč tyto dva isoleuciny v hmotě chybí, je pravděpodobně způsoben tím, že se v sekvenci vyskytují tři ILE za sebou a to může způsobovat sterické bránění. V chemické syntéze to mělo být zohledněno úpravou podmínek a rekaplováním, což ale nakonec provedeno nebylo.

Další maximum v záznamu pro hmotu o váze 1397 m/z odpovídá H1 bez jednoho izoleucinu (Obr. 59 b). Hmota o molekulové váze m/z označená na Obr. 59 d) odpovídá hmotě celého peptidu H1 a na záznamu z analytické kolony jí odpovídá největší maximum. Další hmota o m/z 1403 v záznamu odpovídá sekvenci H1 bez jednoho threoninu Obr. 59 c. Množství této hmoty je však zanedbatelné.



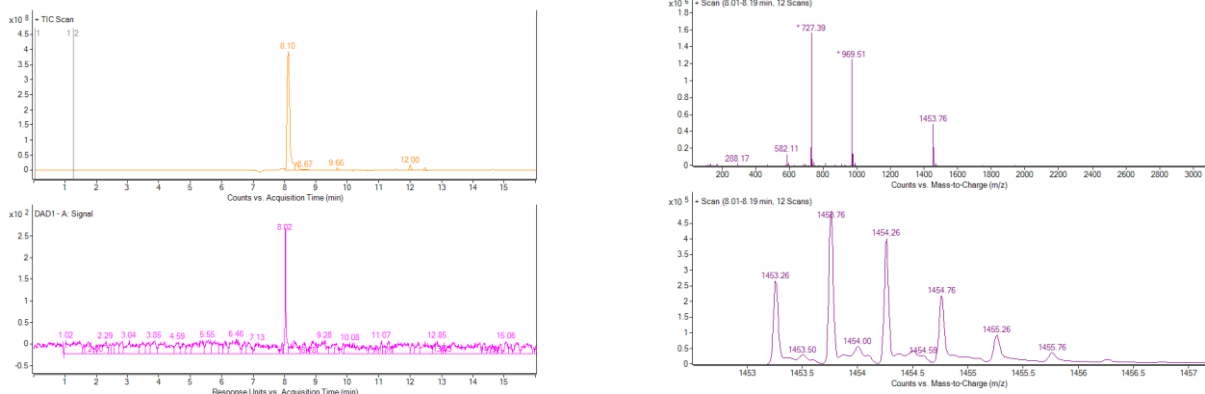
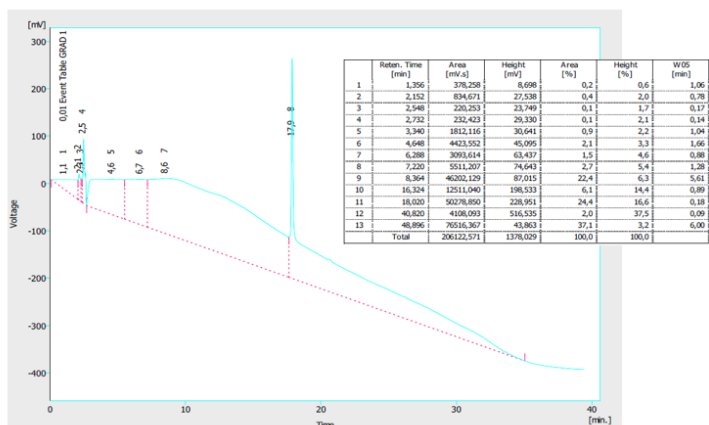
**Obř. 58:** Původní záznam z LC-MS pro hmotu odpovídající surovému peptidu H1 kolicinu U vytvořený na ÚOCHB AV ČR. Horní část obrázku odpovídá průchody hmoty kolonou – viditelná jsou tři hlavní maxima. Látka v koloně je detekována dvěma detektory A) TIC („Total Ion Current“) a B) UV detektor („diode array“, DAD).





**Obr. 59:** Původní záznam z LC-MS pro hmotu odpovídající surovému peptidu H1 kolicinu U (pro tři maxima) vytvořený na ÚOCHB AV ČR. Kroužkem je označena hmota odpovídající molekulové váze AMK sekvence H1 kolicinu U. Dále jsou označeny dvě další látky nejčteněji zastoupené v koloně, kterým chybí např. některá AMK v sekvenci H1. V části c) jsou pak zobrazena již zanedbatelná množství ostatních látek v koloně.

Na základě této analýzy byla následně vyměněna analytická kolona za preparační, zvolen nevhodnější gradient acetonitrilu pro promývání kolony a eluované frakce byly postupně sbírány. Takto byla jímána i frakce obsahující hmotu o molekulové váze sekvence H1 kolicinu U odpovídající největšímu maximu z MS. Poté byla ještě ověřena čistota této preparované látky. Preparace peptidu o požadované sekvenci H1 kolicinu U proběhla úspěšně, jak je patrné ze záznamu Obr. 60. Peptid byl poté ještě lyofilizován.



**Obr. 60:** Původní záznam z LC-MS pro hmotu odpovídající preparovanému peptidu H1 kolicinu U vytvořený na ÚOCHB AV ČR. V horní části je záznam z průchodu hmoty kolonou, ve spodní levé části je zobrazena látka detekovaná oběma detektory TIC a DAD, ve spodní pravé části je pak m/z poměr této látky.

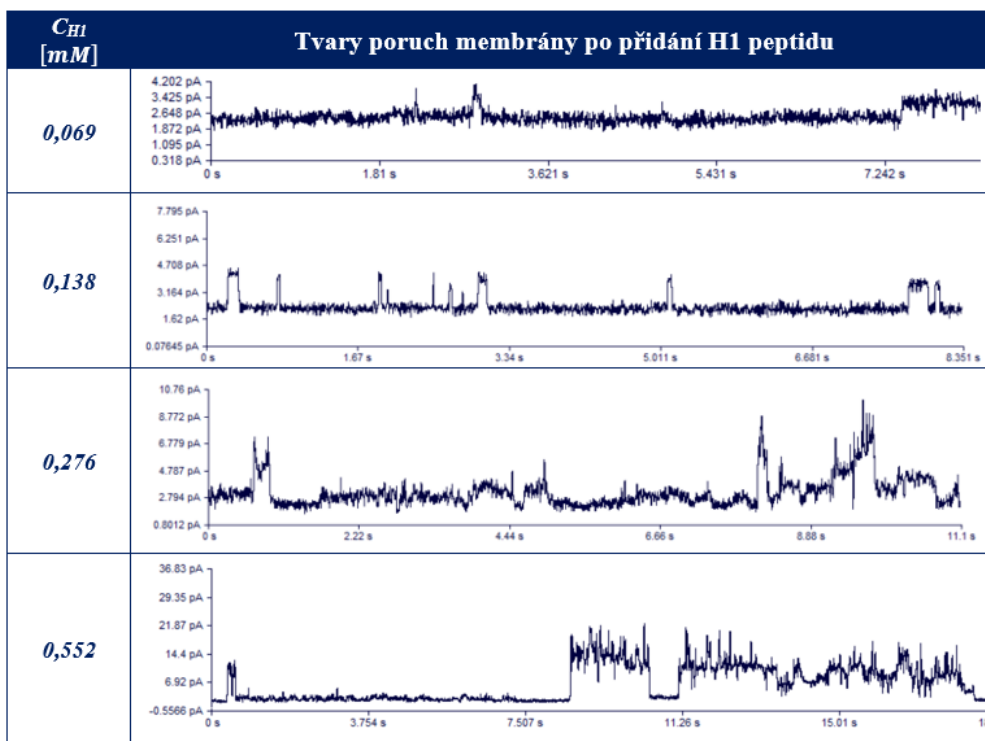
### Shrnutí

Celkově se podařilo chemickou syntézou na pevné fázi připravit 6,2 mg čistého preparovaného peptidu odpovídající sekvenci H1 kolicinu U. Dalších cca 80 mg surového peptidu H1 kolicinu U nebylo zatím použito k purifikaci, bylo pouze uskladněno v mrazáku.

## 5.7 Chování H1 na BLM

Po chemické syntéze peptidu H1 kolicinu U jsem mohla ověřit, zda je schopný v lipidové membráně tvořit póry. Využila jsem k tomu metody měření na BLM v naší laboratoři Fyziologie bakterií PřF UK. Cílem bylo zjistit, zda se v nějaké koncentraci bude peptid H1 chovat vůči membráně pórtvorně. K experimentům byla zvolena membrána z azolektinu (směs lipidů izolovaných ze sóji). Důvodem pro volbu této membrány byla řada již existujících měření chování celé CTD kolicinu U, která byla provedena právě na membránách z těchto lipidů. Měřila jsem celkem čtyři různé koncentrace peptidu H1 v roztoku na třech lipidových membránách (tzn. pro každou koncentraci H1 jsem provedla tři měření). Každé jedno měření probíhalo pod dobu 30 minut.

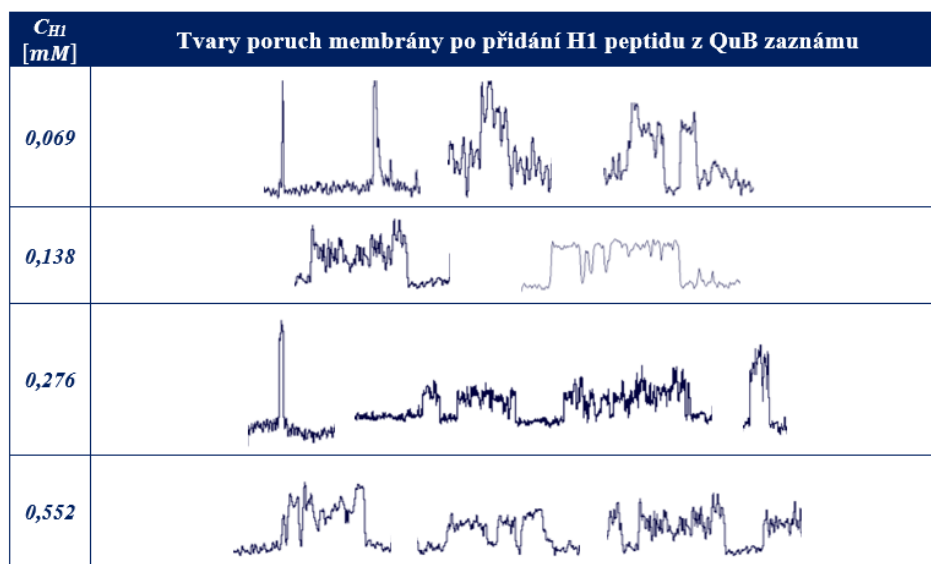
Záznam pórtvorné aktivity H1 pro jednotlivé koncentrace je zobrazen na Obr. 61. Z něj je patrné, že H1 vykazuje pórtvornou aktivitu a narušuje stabilitu lipidové dvojvrstvy.



**Obr. 61:** Záznam pórtvorné aktivity H1 pro jeho různé koncentrace v roztoku. Pravoúhlé skokové změny protékajícího proudu jsem považovala za otevření a uzavření kanálu. Pro jednotlivé záznamy se liší škály časové i proudové osy. Proud byl zaznamenáván s vzorkovacím kmitočtem 1kHz a dále dodatečně filtrován „low-pass“ filtrem 50 Hz.

Na základě těchto měření (Obr. 61) předpokládám, že se peptidy H1 inkorporují do membrány jako monomery. V záznamu by monomery H1 mohly být zastoupeny krátce otevřenými událostmi o nízké vodivosti. Později dochází pravděpodobně k oligomerizaci H1 v membráně, čemuž by mohly odpovídat „střední póry“ o delší době stability a vyšší hodnotě vodivosti. Ke konci měření peptidy H1 v membráně nejspíše silně oligomerovaly, nebo byla jejich koncentrace neúměrně vysoká. Docházelo k tvorbě ještě větších pórů, až přestal být záznam čitelný. Z tohoto důvodu v některých datech chybí jistá část událostí (otevření a zavření kanálu), které zjevně proběhly, ale lze je špatně identifikovat.

Z obrázků (Obr. 62) je patrné, že H1 tvoří v lipidové membráně více různých typů pórů o různých hodnotách vodivosti. Z toho předpokládám, že se fosfolipidy membrány v tvorbě póru účastní nikoliv jako pasivní činitel, nýbrž jako dynamicky rovnocenný interakční partner H1 peptidu. H1 je pravděpodobně využívá k tvorbě póru.

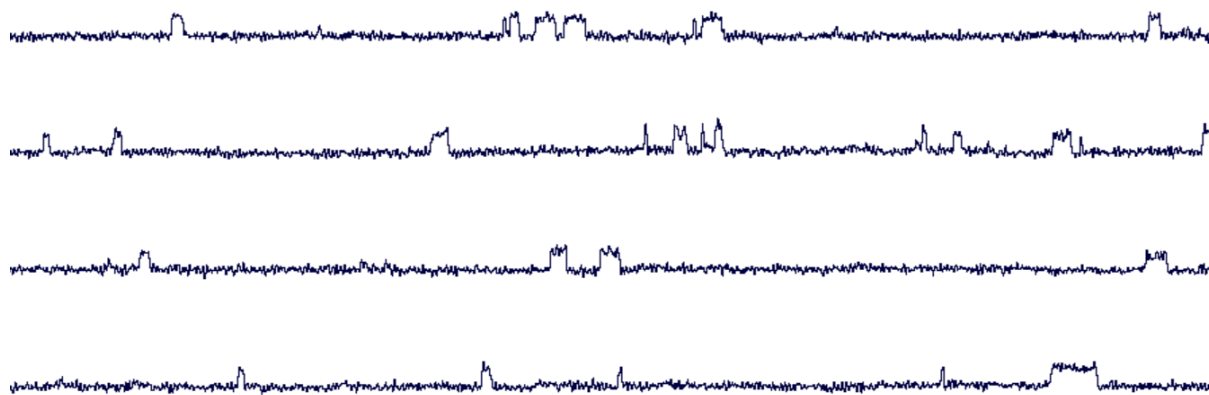


**Obr. 62:** Typické poruchy lipidové dvojvrstvy po přidání H1 do roztoku (pH 7) 1 M NaCl k azolektinové membráně. Obrázek pochází z QuB záznamu a neobsahuje měřítko, jde pouze o záznam tvaru (dynamiky) různých pórů vytvářených peptidem H1. Některé události byly velmi přiblíženy a na záznam byl aplikován filtr ke snížení šumu (50 Hz).

Další ukázkový záznam z vyhodnocování dat z QuB je na Obr. 63. Konkrétně se jedná o záznam z měření pro koncentraci 0,138 mM H1 na v pořadí druhé membráně. V cca prvních pěti minutách měření byla lipidová membrána rozrušována krátkými skokovými poruchami (změna

proudu o 2-3 pA). Předpokládám, že by se mohlo jednat póry tvořené např. dimery či trimery H1. Jelikož se tyto poruchy nevyskytovaly v kontrolních měřeních pouze lipidových membrán bez přidaného H1, považuji je za specifický projev H1.

Velmi krátké události by mohly odpovídat poruše vyvolané zabudováním monomeru H1 do lipidové membrány. Na celém intervalu 30. minutového měření pro lipidovou membránu bez přidaného H1 se vyskytly maximálně tři podobné velmi krátké události. V tomto měření byla membrána tímto způsobem mnohem častěji narušována. Její poruchy byly nejčastěji detekovatelné na počátku měření. Později v průběhu měření se začaly tvořit póry o větší vodivosti a bylo těžší detekovat tyto drobné poruchy s nízkou vodivostí. Nicméně i tak se vyskytovaly téměř prakticky ve všech měřeních s H1. Všechna tato měření byla provedena přes noc kvůli minimalizaci vnějších rušivých vlivů.

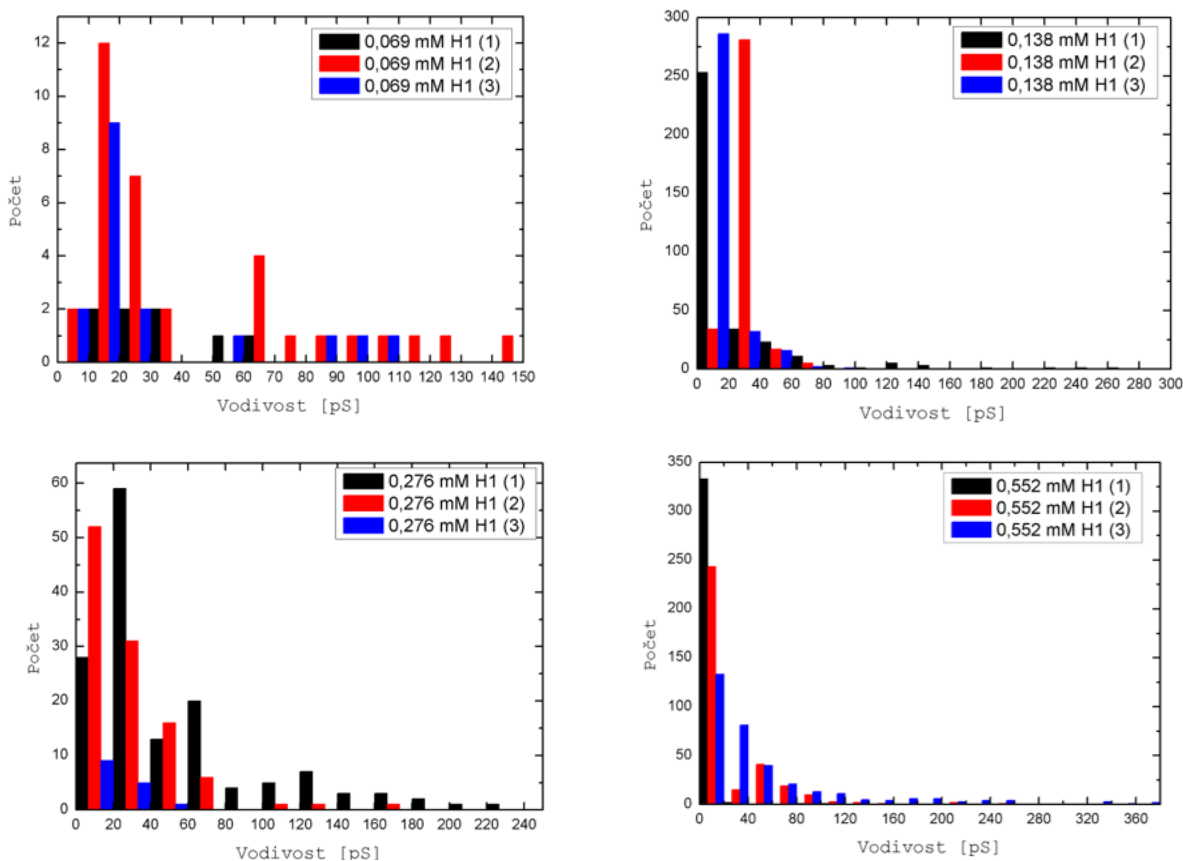


**Obr. 63:** QuB záznam poruch na azolektionové membráně v 1 M NaCl v pH 7 po přidání H1 do celkové koncentrace 0,138 mM. Každý ukázkový záznam trval cca 0,2 s, častá výchylka proudu byla kolem 2,4 pA. Proud byl filtrován filtrem 50 Hz.

Počet otevřených pórů, které jsem byla schopná rozlišit, se v měřeních lišil. Patrně proto, že peptid přidaný do roztoku (a v něm celkově v nízké koncentraci) na cis stranu membrány musel k lipidové dvojvrstvě nejprve difundovat. V dalších opakovaných měřeních se počet událostí již zvyšoval.

Četnosti pórů o dané vodivosti jsou zachyceny na následujícím obrázku 64. V grafech je často jen jedno maximum, což podporuje myšlenku jedné převládající frakce kanálů v dané koncentraci. Dvě maxima či více by pravděpodobně ukazovala na možnou oligomerizaci. Nejčastěji zastoupená hodnota vodivosti se mění v rámci koncentrace H1. Pro nižší koncentrace

byly nejčastěji tvořeny póry o vodivosti 15 – 20 pS (nejčastěji 17 pS). Nicméně z grafů je vidět značné rozpětí hodnot vodivosti.



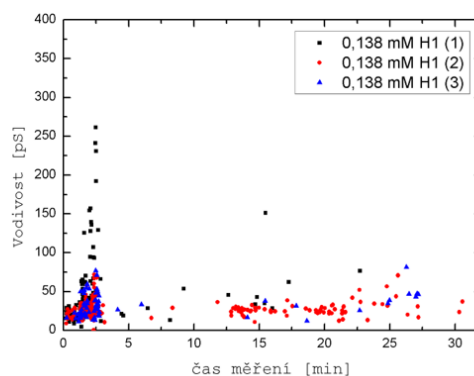
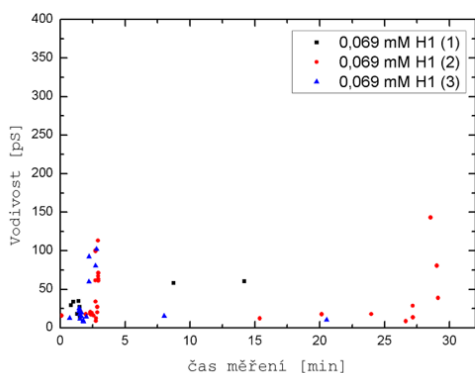
**Obr. 64:** Histogramy hodnot vodivosti pro různé póry vytvořené H1 kolicinem U v lipidové membráně (azolektin) v 1 M NaCl v pH 7. Nadpis grafu obsahuje celkovou koncentraci H1 v roztoku a číslo v závorce pak značí jednotlivá opakování pokusů na nové membráně. Grafy byly zpracovány v programu Origin8.

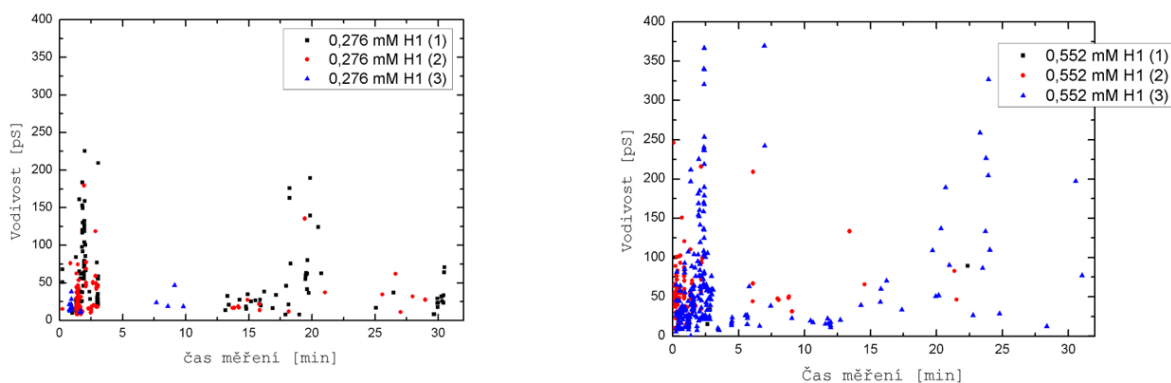
Jak už jsem uvedla výše, počet a vodivost pórů lipidové membrány se měnil v průběhu měření. Peptid H1 se projevoval pórotvorně nejčastěji v určitém čase měření (alespoň tedy pro určité koncentrace). V čase měření 0,5-5 minut od vytvoření nové membrány často docházelo k tvorbě velmi krátkodobých pórů. Kolem 13.-20. minuty se pak začaly objevovat častěji i póry, které zůstaly mnohem déle otevřené a způsobovaly silné narušení dvojvrstvy. Již v tomto čase někdy nebylo možné záznam řádně vyhodnotit. Membrána byla kolem 20. minuty měření nejvíce rozrušována. Ke konci cca 25. minuty docházelo někdy opět ke stabilizaci membrány (pokles proudu na bazální úroveň). Na 30. minutě se ovšem obvykle začaly tvořit opět póry, tentokrát o

ještě větší velikosti při napětí +50 mV (cis), které již prakticky nešly rozlišit. Já svým experimentem obvykle na 30. minutě měření končila.

Tyto různé frakce kanálů objevujících se ve třech intervalech měření jsou na Obr. 65. Bohužel je tento trend patrný pouze u dobře rozlišitelných kanálů a objemnějšího souboru dat k vyhodnocení. U všech ostatních bylo toto chování částečně také pozorováno, ale nebylo možné kanály v 15-20 minutách dobře identifikovat podle jejich otevírání nebo zavírání. Doba jejich otevření byla mnohem delší a otevíralo se jich pravděpodobně několik současně. Tím se jejich rozlišitelnost zkomplikovala.

Myslím, že tyto grafické výnosy celkově podporují toroidní model stavby póru tím, že zobrazují, že H1 má silnou tendenci v membráně nějakým způsobem přetrvávat. V průběhu tří měření po sobě (celková doba měření 90 minut) pro stejnou koncentraci H1 se počet otevíraných kanálů v membráně rapidně zvyšoval. Zdá se, že jakmile se jednou do membrány H1 inkorporuje, je pro něj již nevýhodné přejít zpět do vodné fáze. Elektrostatické interakce s lipidovými hlavičkami a hydrofobní oblast membrány peptidu H1 tedy zřejmě poskytují optimální prostředí, ve kterém je jeho sekundární struktura pravděpodobně stabilní. Pokud tomu ale tak není a jeho sekundární struktura je nestabilní, tak zásadní roli hrají zřejmě pouze elektrostatické interakce krátkého i dlouhého dosahu, které znemožňují, aby opustil okolí lipidové membrány. Ještě je také nutno vzít v potaz, že peptid H1 byl uměle syntetizován a vliv jeho nepřírozeného N- a C- konce může hrát také jistou roli v nevzdalování od okolí membrány a tím zvyšovat pravděpodobnost jeho membránové inkorporace.





**Obr. 65:** Frakce kanálů objevujících se v určitém čase měření na BLM. Na záznamu jsou vždy zobrazeny všechny tři testované membrány. Častý výskyt nějaké hodnoty vodivosti v histogramech může být vázán na opakované otevírání jediného póru. Grafy byly zpracovány v programu Origin8.

Zajímavé je, že koncentrace H1 0,276 mM (2. testovaná membrána) a 0,552 mM (1. testovaná membrána) působila na lipidovou membránu spíše stabilizačně. Vysvětlují si to tím, že jsem v té době obnovovala tyto testované membrány přidáním nových membránových lipidů a roztok promíchala. Tím vlastně mohlo dojít ke snížení efektivní koncentrace peptidu v membráně. V měřeních s nižší koncentrací tento efekt nebyl tolik znatelný.

To by mohlo naznačovat, že tato použitá koncentrace možná způsobila klastrování nově přidaných peptidů H1 ve vodné fázi. Jejich vyšší koncentrace by mohly odpovídat vyšší četnosti klastrů (nebo vyšší velikosti klastru). K tomu, aby se mohly monomerní H1 opět zabudovat do membrány, by bylo třeba tento klastr peptidů H1 nejprve rozpustit. Např. na styku vodné fáze s membránou elektrostatickým působením s nabitými částmi lipidů. Nicméně peptid H1 byl snadno rozpustný v destilované vodě, tudíž by se měl vyskytovat spíše ve formě monomerní. Pokud se tedy v propojování monomerních jednotek nějakým způsobem silně neuplatňují např. ionty  $\text{Na}^+$ . Další možností pak je, že se jedná o zcela náhodný jev, a když bych provedla vícero měření pro tuto koncentraci, pozorovala bych opět vysoký počet otevřených kanálů. Anebo se jedná o neúmyslně vyvolanou chybu měření.

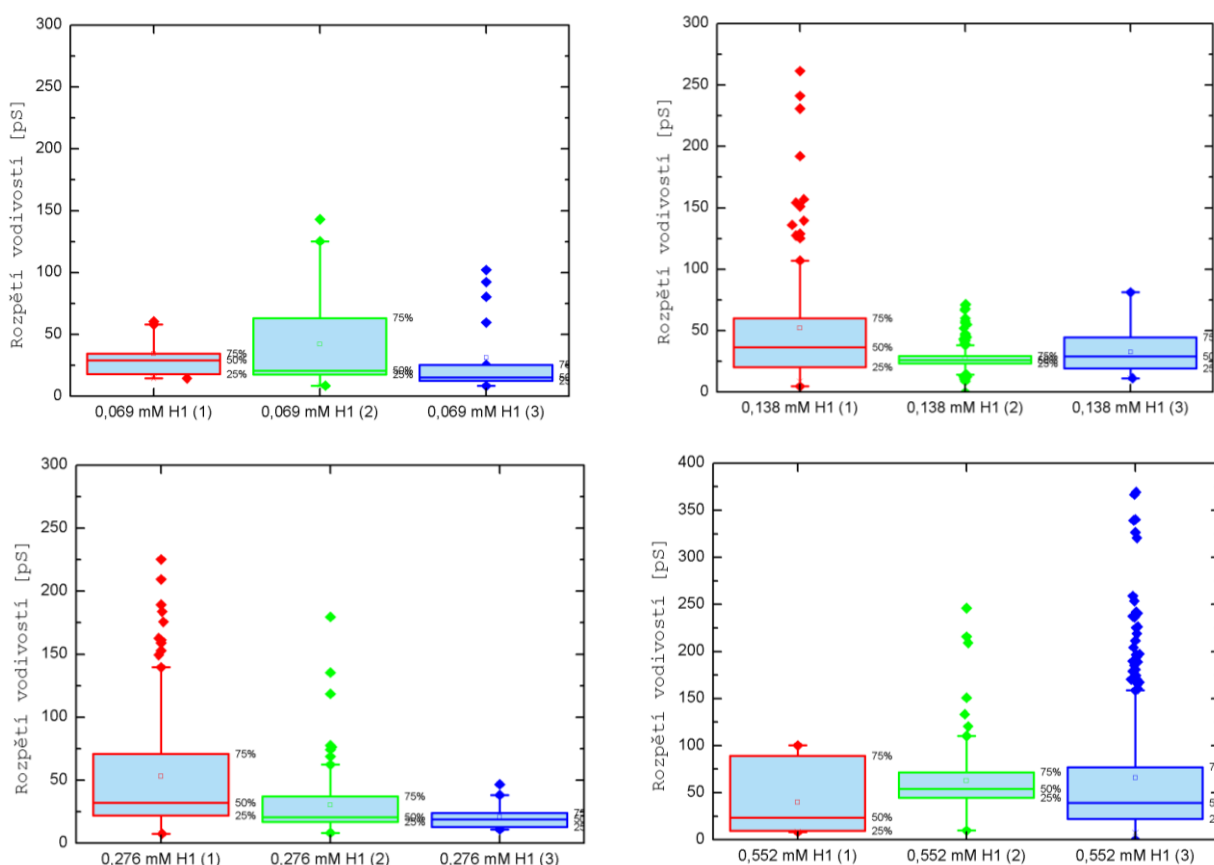
Dále jsem se rozhodla podívat se na to, jaký charakter vykazuje závislost vodivosti H1 pórů na koncentraci H1. Při měření na BLM jsem zaznamenala různě velké kanály různé dynamiky (možná způsobené interakcí H1 s membránovými lipidy) a v MD simulaci jsem pozorovala tvorbu dimeru a stabilních trimerů. Mojí hypotézou tedy byly, že peptidy H1 jsou v lipidové membrány



schopny oligomerovat. To jsem chtěla ověřit vynesemím závislosti počtu vytvořených pórů na použité koncentraci. Předtím jsem se však pokusila zjistit, jakou mají tato data výpovědní hodnotu. Statistika, kterou jsem použila pro zpracování výše uvedených dat, je uvedena na Obr. 66. Vždy jsem vypočítala průměr z každého měření (čtvereček v ploše grafu) na jedné membráně. Odlehlé hodnoty nebyly do statistiky vzaty (viz Tab. 14)

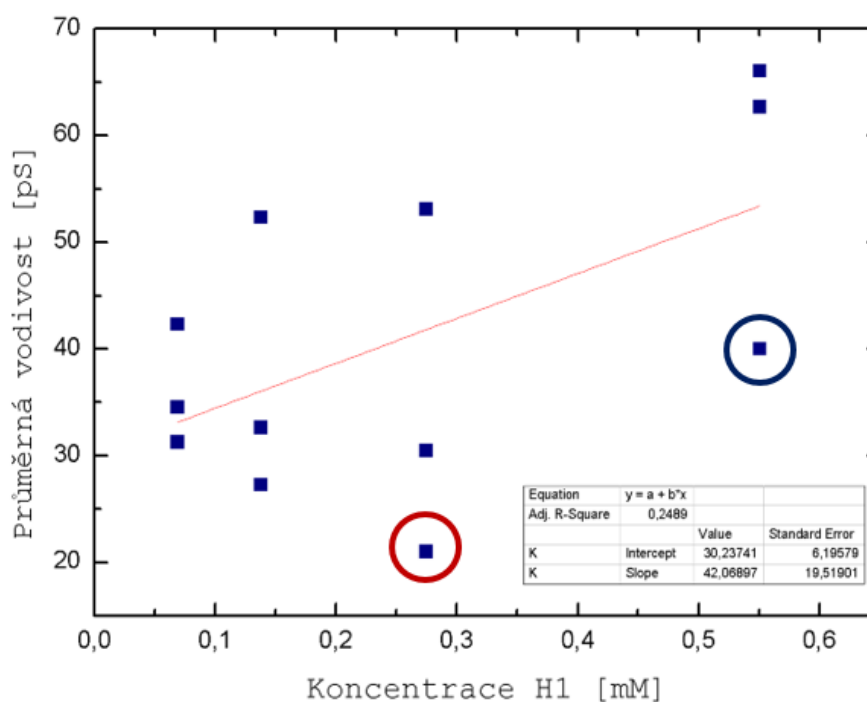
Celkový průměr vodivosti [pS] / S.D. / počet událostí			
koncentrace H1 [mM]	1. membrána	2. membrána	3. membrána
0,069	34,49 / 16,84 / 8	42,27 / 27,26 / 34	31,23 / 31,31 / 17
0,138	52,30 / 49,24 / 107	27,25 / 8,581 / 337	32,58 / 16,00 / 70
0,276	53,07 / 46,15 / 146	30,43 / 25,38 / 108	20,96 / 10,20 / 15
0,552	39,99 / 38,58 / 7	62,64 / 38,07 / 99	66,01 / 71,02 / 254

**Tab. 14:** Statistika dat pro vynesení závislosti vodivosti na koncentraci.



**Obr. 66:** Statistika dat pro vynesení závislosti vodivosti na koncentraci. Zobrazen je medián a percentily (1%, 99%) chybovou úsečkou. Barvy odpovídají jednotlivým testovaným membránám. Odlehlé hodnoty jsou zobrazeny kosočtvercem. Grafy byly zpracovány v programu Origin8.

Vypočítala jsem korelaci (Origin8) průměrné vodivosti pórů na koncentraci H1 v roztoku. Pearsonův korelační koeficient měl kladnou hodnotu 0,56. Graficky jsem tedy vynesla celkové průměry vodivostí napříč čtyřmi měřeními pro jednotlivé koncentrace peptidu H1 v roztoku (Obr. 79). Závislost jsem analyzovala lineární regresí. Hodnota směrnice přímky byla 42,07. Veličiny na sobě tedy závisejí. Ale myslím si, že toto vyhodnocení je zatíženo velkou chybou. Rozlišení kanálů, které vytvářel tento takřka „antimikrobiálně“ působící peptid H1, bylo v některých případech pro mne obtížné, nebo jsem si delších kanálů na QuB záznamu nemusela všimnout a nezahrnula jsem je tak do analýzy. Např. v případě 0,276mM H1 pro 2. testovanou membránu nebylo možné množství otevíraných kanálů vůbec rozlišit. Vizuálně jsem viděla, že jsou otevírány a proud, který membránou díky nim protékal, odpovídal cca střední hodnotě proudu mezi 0,069mM a 0,0552mM koncentraci H1 (není ukázáno). Tyto kanály jsem nebyla schopna však vyhodnotit pomocí softwaru QuB kvůli špatnému identifikování počátku jejich otevření nebo uzavření. Toto hodnocení bylo proto velmi neobjektivní.



**Obr. 67:** Grafický výnos závislosti průměrných hodnot vodivostí na použité koncentraci H1 a proložený lineární přímkou. Graf byl vygenerován v programu Origin8.

Z tohoto důvodu jsem se rozhodla vyloučit soubor dat z měření pro 0,276mM koncentraci H1 na 3. testované membráně (červeně zakroužkováno v Obr. 67 č). a 0,0552mM koncentraci H1 pro 1. testovanou membránu (modře zakroužkováno v Obr. 67 č). Tyto datové soubory obsahovaly pouze málo událostí. To mohlo být způsobené neochotou zabudování dalších H1 do membrány, mohlo jít o čistě náhodný jev, nebo to bylo způsobeno chybou měření. K přípravě 3. testované membrány pro 0,276 mM koncentraci H1 byly totiž použity nové lipidy. Tím mohla vzniknout chyba, protože nyní předpokládám, že je H1 schopný se k membránovým lipidům vázat. Postup experimentu měl být pro sledování závislosti aktivity H1 na použité koncentraci peptidu H1 navržen jiným způsobem (viz diskuze). V případě vyloučení těchto dat, byla pak závislost silnější (není ukázáno). Dále se ale také ukázalo, že k zaznamenání přesného tvaru závislosti vodivosti kanálů (či počtu otevřených pórů) na použité koncentraci mám získáno příliš málo dat.

### ***Shrnutí studia peptidu H1 na BLM***

Závěrem tedy je, že tvar závislosti celkové vodivosti H1 (a počtu otevřených pórů) na jeho koncentraci nelze z těchto dat jednoznačně vyvodit. K experimentálnímu prokázání oligomerizace H1 bude třeba pokusy opakovat pro více membrán, více měřených koncentrací H1 a pravděpodobně i jiným postupem. Jisté však je, že je uměle syntetizovaný peptid H1 CTD kolicinu U je schopný silně narušovat funkci lipidové dvojvrstvy a počet otevřených pórů v membráně, které jsem detekovala, se zvyšuje s jeho zvyšující se koncentrací. To byl také hlavní cíl tohoto experimentálního studia. Dále předpokládám, že H1 tvoří minimálně dvě frakce pórů v závislosti na době měření. Také předpokládám, že H1 v lipidové membráně oligomerizuje, ale zatím jsem to neprokázala. Dále si myslím, že se H1 do membrány zabudovává jako monomer a má sklon se silně vázat k membránovým lipidům. Experimentálnímu ověření tohoto předpokladu se budu věnovat ve své další práci. V té bych chtěla kromě výše uvedeného ještě řádně prostudovat vliv iontů vápníku na pórotvornost H1 peptidu. Také bych chtěla prověřit chování H1 vůči membráně při měření s vyšším napětím (+80 mV cis), či opačné polaritě. Část těchto měření proběhla již v této práci, ale jejich vyhodnocení není do této práce zařazeno (mj. i kvůli nízkému počtu opakovaných měření). Dále bych také chtěla prověřit chování H1 na membránách o jiném lipidovém složení (POPC lipidy, či lipidy *E.coli*).

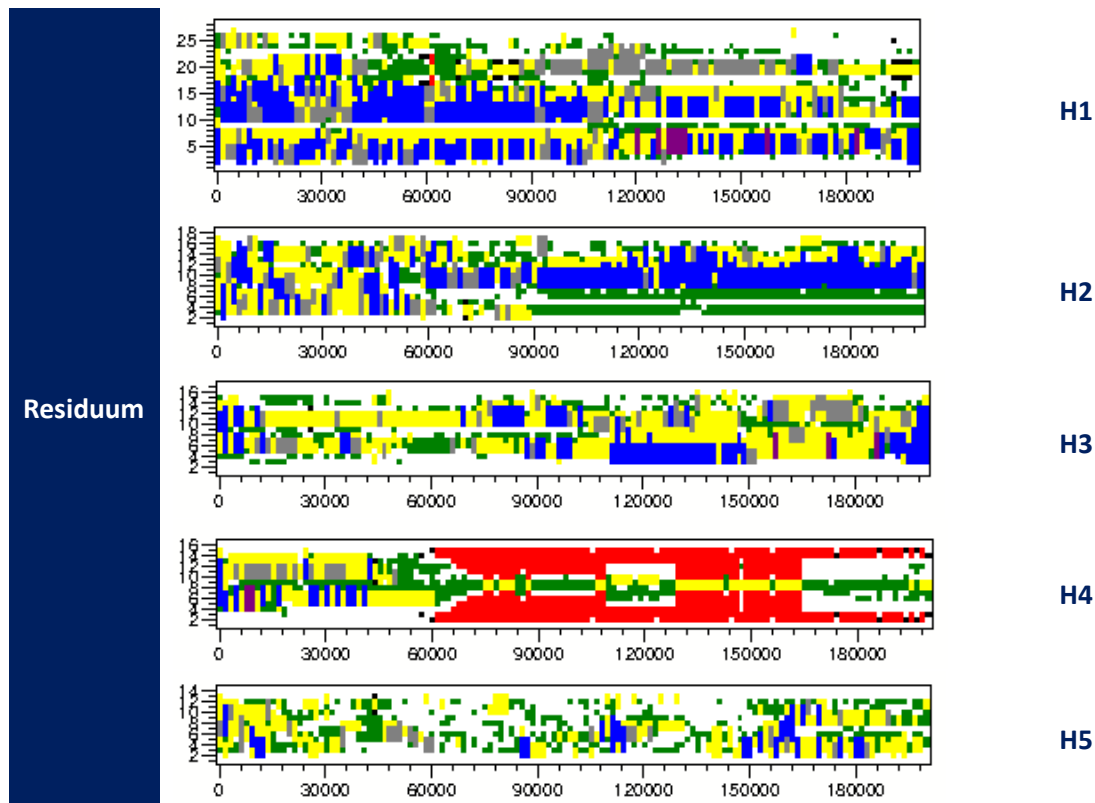
## 5.8 Vlastnosti dalších peptidů CTD kolicinu U v MD simulacích

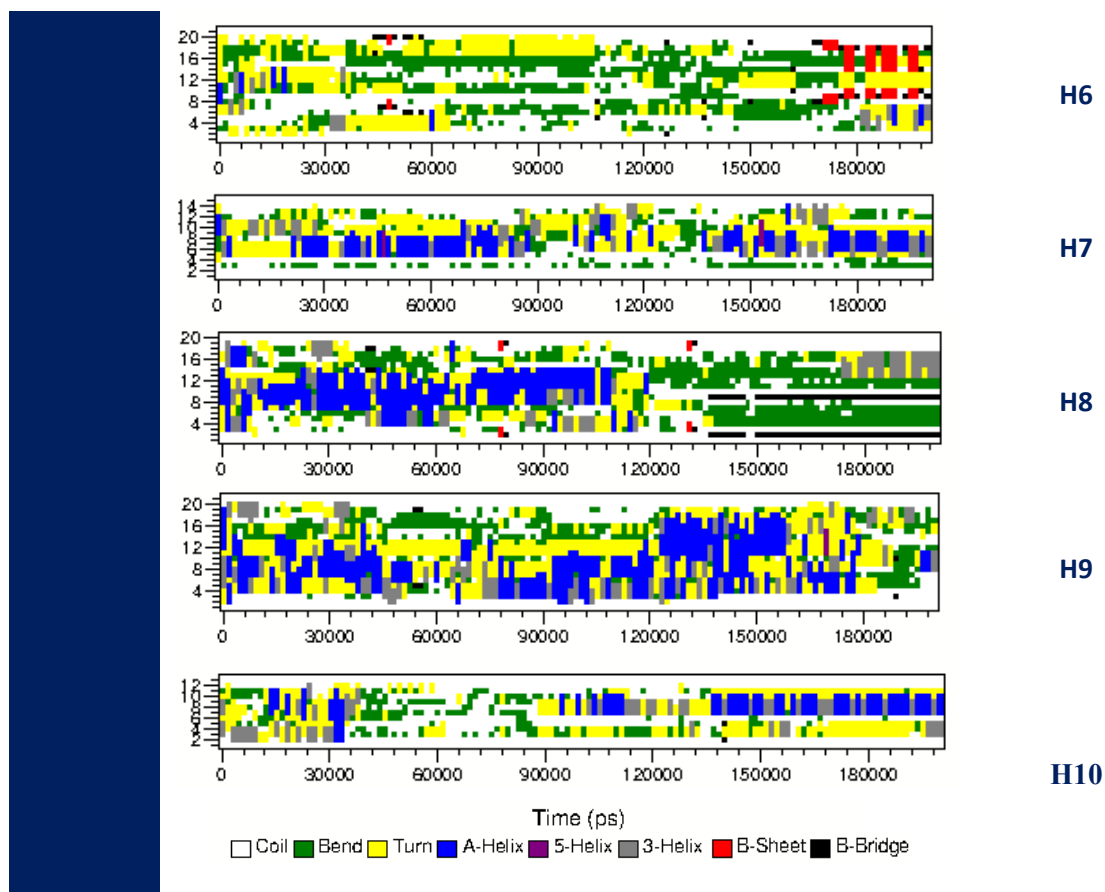
### 5.8.1 Přehled základních vlastností jednotlivých H2-H10 CTD kolicinu U

Kromě helixu H1 CTD kolicinu U byly v této práci studovány i ostatní helixy CTD kolicinu U. Byly také provedeny obdobné analýzy jejich chování v membráně POPC jako v případě peptidu H1. Ty zde však již většinou uvedeny nejsou.

### 5.8.2 Chování jednotlivých helixů H2-H10 CTD kolicinu U v čisté vodě

Z porovnání vývoje sekundárních struktur (Obr. 68) jednotlivých peptidů CTD kolicinu U ve vodě je zřejmé, že jejich helikální struktura byla u většiny z nich téměř ztracena. Z původních  $\alpha$ -helixů zbyly jen určité helikální oblasti, které se periodicky i neperiodicky objevovaly. Např. H4 tvořil podstatnou část MD simulace ve vodě  $\beta$ -sheet.  $\beta$ -sheetová struktura se dále objevila i u H6. Oba tyto peptidy v následných MD simulacích nepreferovaly ani hydrofobní prostředí membrány. Již během přípravné MD simulace došlo prakticky ihned po jejich vložení do membrány k jejich téměř okamžitému rozvolnění.





**Obr. 68:** Srovnání sekundární struktury izolovaných peptidů H1 až H10 CTD kolicinu U, kterou zaujímají samostatně ve vodě při 310 K. Graf byl získán programem DSSP v Gromacsu.

### 5.8.2.1 Chování jednotlivých helixů H2-H10 při vertikálním vložení do POPC membrány

Peptid **H2** (Obr. 69) si udržoval velmi dobrou helikální strukturu (Obr. 70) v případě, že byl v membráně orientován vertikálně. V určité části MD simulace se v jeho struktuře také tvořil kink. Způsoboval průchod vody membránou. Jeho AMK sekvence je však příliš krátká a velký vliv zde mohou hrát umělé konce struktury. V případě vložení H2 do membrány POPC, v jejíž blízkosti se před spuštěním MD vyskytovalo větší množství molekul vody, docházelo k jeho překlpení do horizontální pozice u POPC hlaviček. Nebyl také helikální. Původně se tedy zdálo, že se jedná o strukturu velmi citlivou na přítomnost vody. Tomu však neodpovídalo její chování v čisté vodě. Proto byly provedeny další MD simulace – H2 vloženého přímo pod POPC hlavičky a přímo do středu membrány v horizontální orientaci, segmentu CTD kolicinu U H1-H2, H2-H3.

Peptid **H3** je stabilně helikální, ztenčuje membránu v jejím průřezu a způsobuje průchod vody membránou. Opět se ale může jednat o umělé chování způsobené nepřírodným N- a C-koncem.

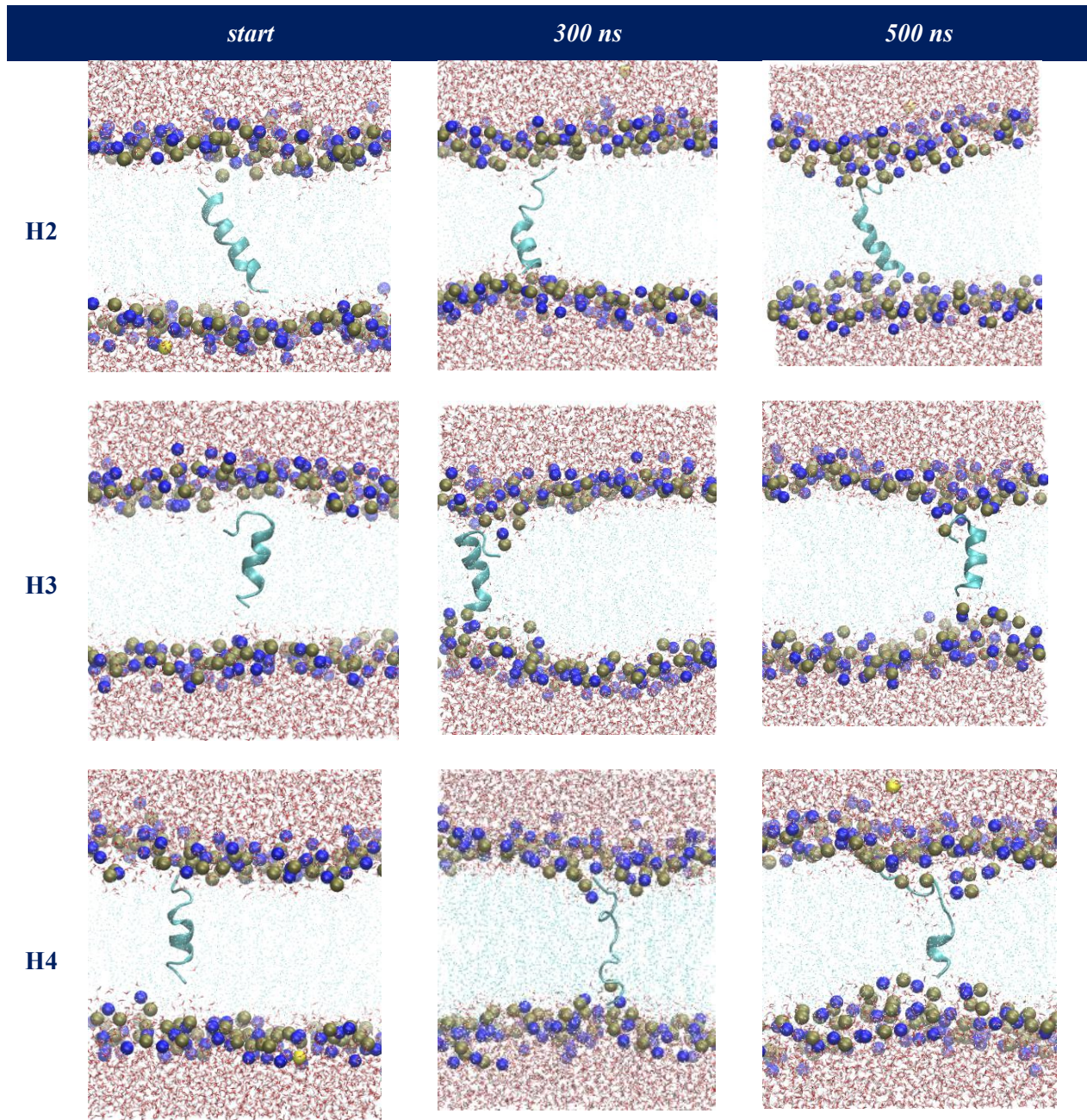
Peptidy **H4 a H6** okamžitě ztratily v membráně svou helikální strukturu. Na obou koncích molekul H4 a H6 jsou umělé C- a N-terminály a další nabitá residua, která pravděpodobně nedovolují odpoutání od polární monovrstvy membrány a drží tak celou strukturu v membráně napříč. Pro případ H6 bylo jeho chování ještě ověřeno přípravou MD simulace, kde byly použity vstupní souřadnice z modelu R-1. Ovšem i chování této struktury H6 bylo naprosto analogické. Již během přípravy, i při fixaci vazeb pomocí *posre.itp*, docházelo k rozrušení helicity ihned potom, co byl H6 přidán do hydrofobní vrstvy membrány. Membrána H4 a H6 destabilizuje na struktuře.

Peptid **H5** měl velmi silnou schopnost membránu ztenčit v oblasti, kde jí transmembránově prostupoval. Také způsoboval průchod vody membránou, i když v porovnání s ostatními výše uvedenými spíše méně. Jeho orientace byla vertikální a helicity velmi stabilní. Možnost nepřírodního chování je ale opět vysoká. Jeho chování bylo v tomto případě stabilnější, než když byly při startu MD simulace v blízkosti struktury molekuly vody. Nicméně H5 byl helikální a vertikální v obou případech.

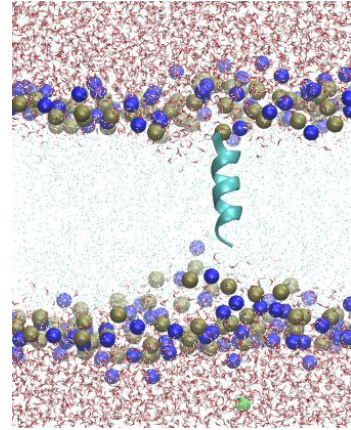
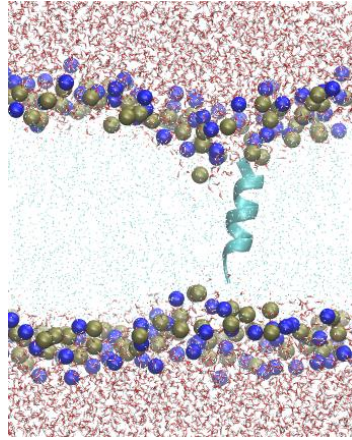
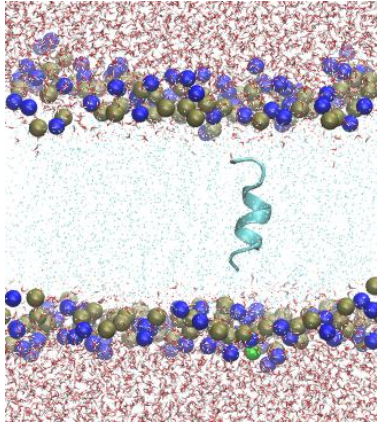
Peptid **H7** změnil svou orientaci z vertikální na horizontální. V MD simulaci, ve které byly však v jeho blízkosti molekuly vody (není zobrazena), si udržoval v POPC membráně poměrně stabilní helikální strukturu ve vertikální orientaci. Svou krátkou sekvencí ztenčoval hydrofobní oblast membrány, ostatně stejně jako působil H5. Ovšem v posledních cca 200 ns jeho poměrně stabilní helikální struktura v membráně náhle zkolabovala. Podezření padlo na velmi časté navazování dvou protiiontů  $\text{Na}^+$  do žlábků ve struktuře H7 v membráně.

**H8 a H9** nabyly v membráně struktury o vysoké helicitě. Membránou neprotékala žádná voda. Jejich chování odpovídalo očekávání.

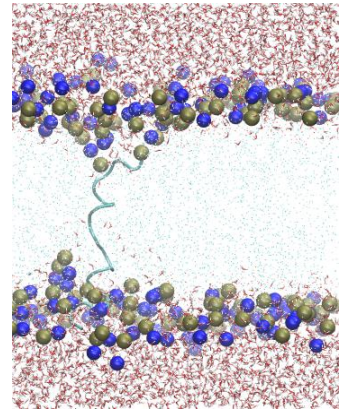
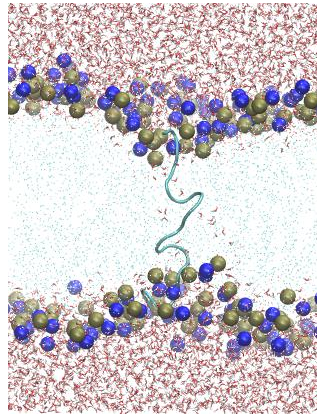
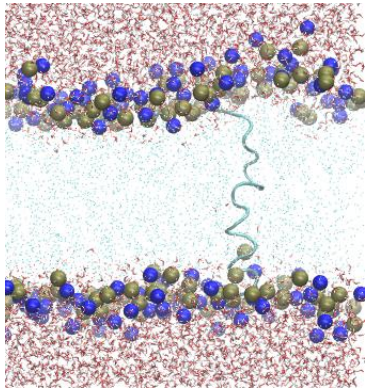
**H10** je velmi krátký peptid s nábojem  $-3 e$  (stejně jako H1). Po jeho vertikálním vložení do membrány došlo v simulaci k jeho překlopení do horizontální orientace. Vyskytoval se poté v polární oblasti membrány a udržoval si částečně helikální strukturu (resp. ji ztrácel a opětovně získával). Toto chování bylo také očekáváno.



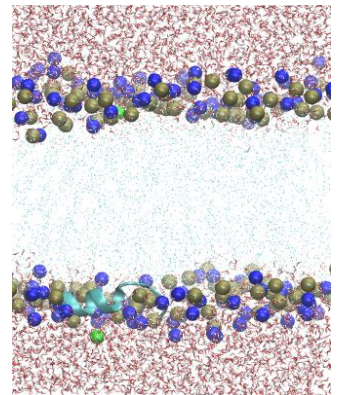
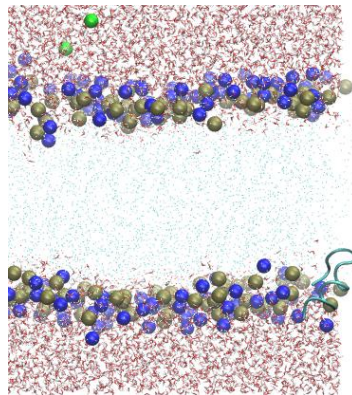
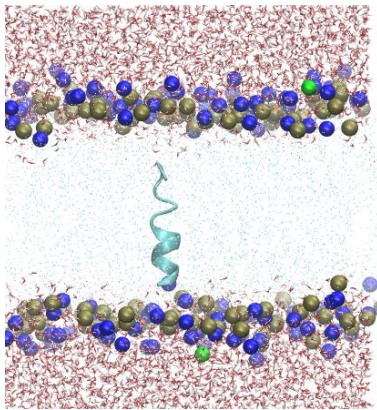
H5



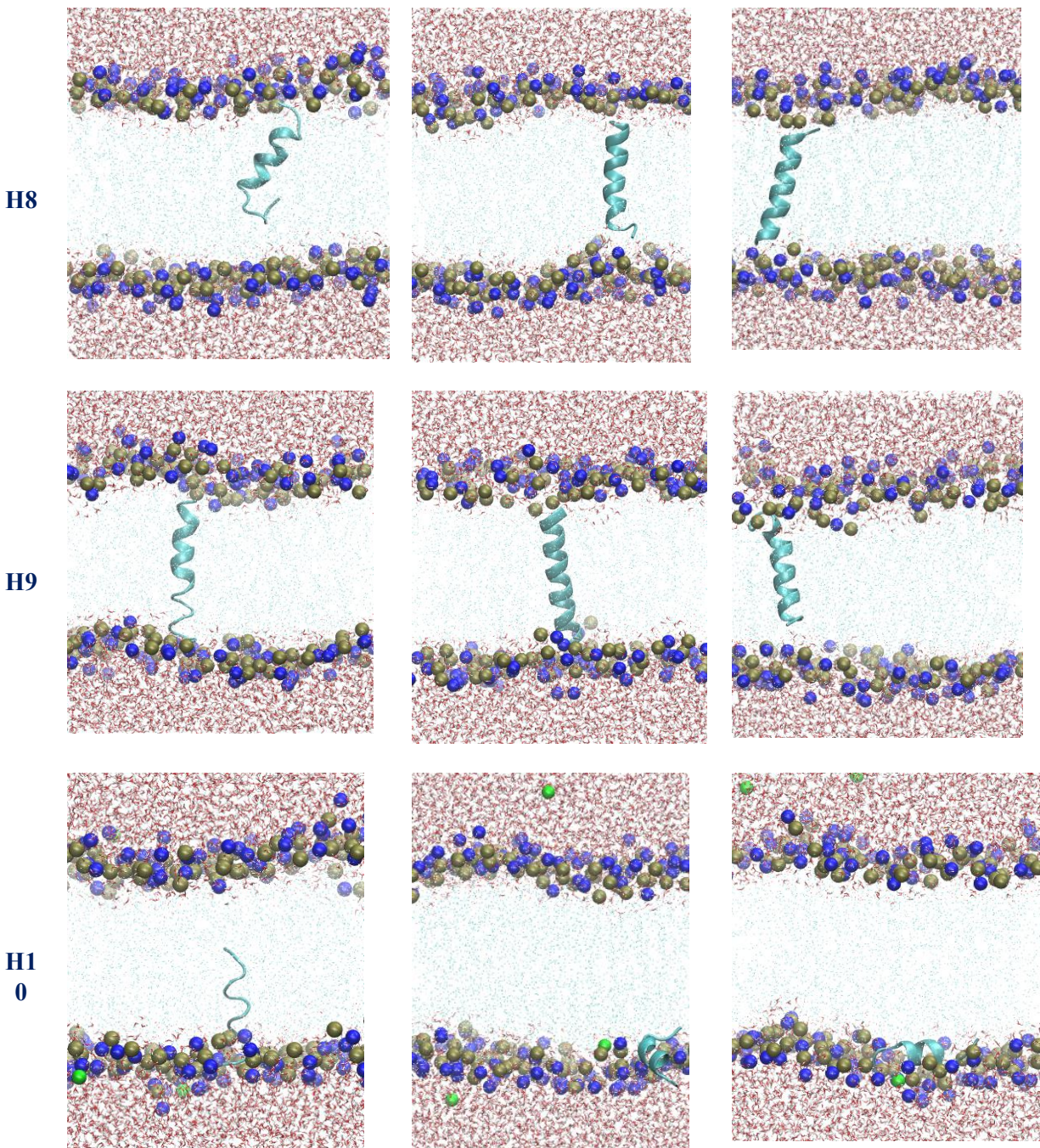
H6



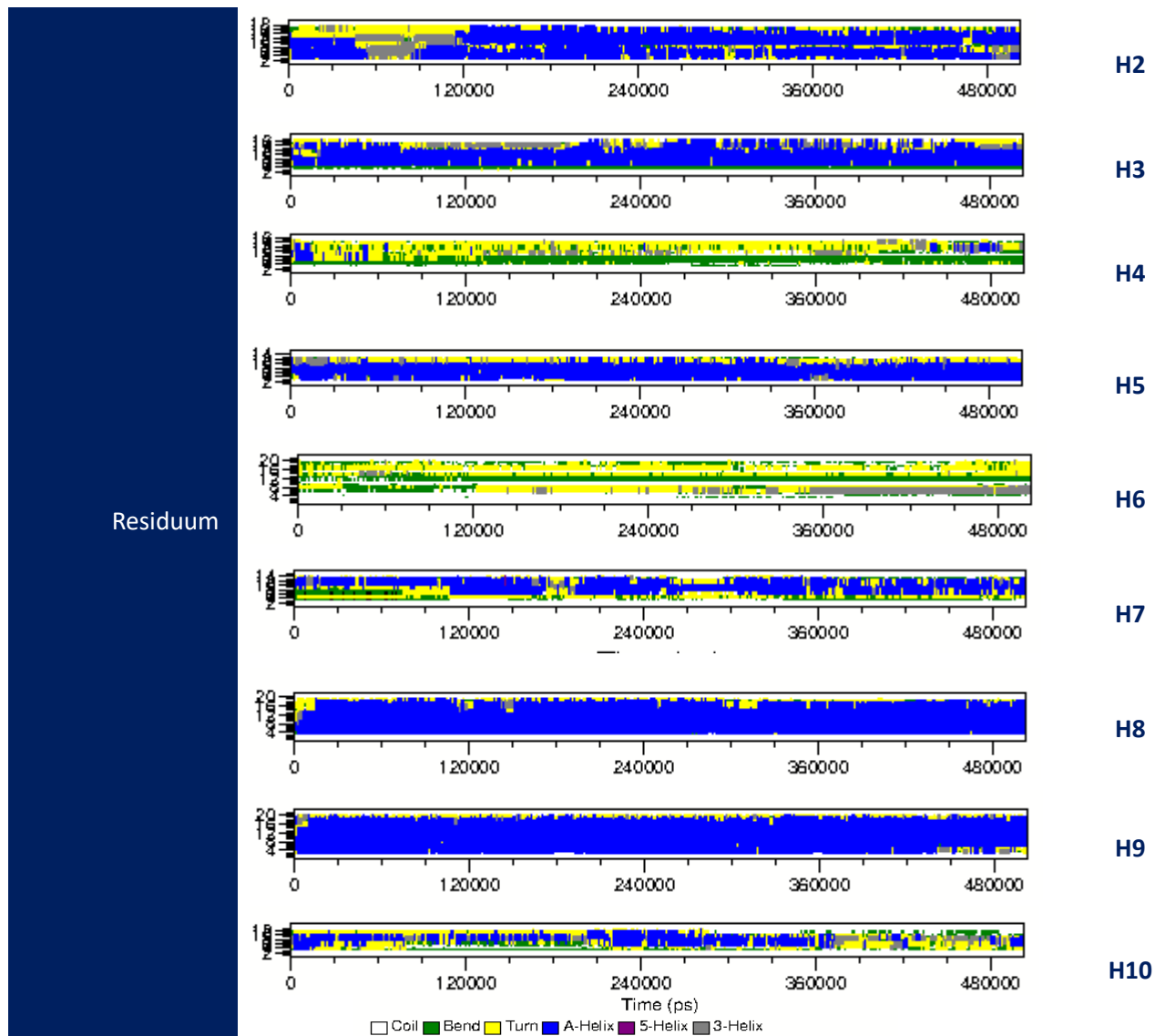
H7







**Obr. 69:** Vizualizace struktury, kterou zaujímaly peptidy H2-H10 CTD kolicinu U. Výchozím modelem pro jejich vstupní souřadnice byl model R-4, ev. v případě H9 R-1. Do membrány byly vloženy ve vertikální orientaci. Barevné značení: modře atomy dusíku POPC (VDW), zlatě atomy fosforu POPC (VDW), zeleně ionty  $\text{Na}^+$  (VDW), žlutě protiionty  $\text{Cl}^-$  (VDW), červeně molekuly vody (Bonds), tyrkysově atomy POPC lipidů (Points). Tyrkysovým zobrazením NewCartoon je vyznačen peptid.



**Obr. 70:** Srovnání sekundární struktury peptidů H2-H10 CTD kolicinu U, kterou zaujímají samostatně v membráně POPC při 310 K. Jejich vstupní orientace byla vertikální.

Shrnutí jednotlivých vlastností izolovaných helixů H2 až H10 pozorovaných při jejich vertikálním vložení do membrány POPC je uvedeno v Tabulce 15.

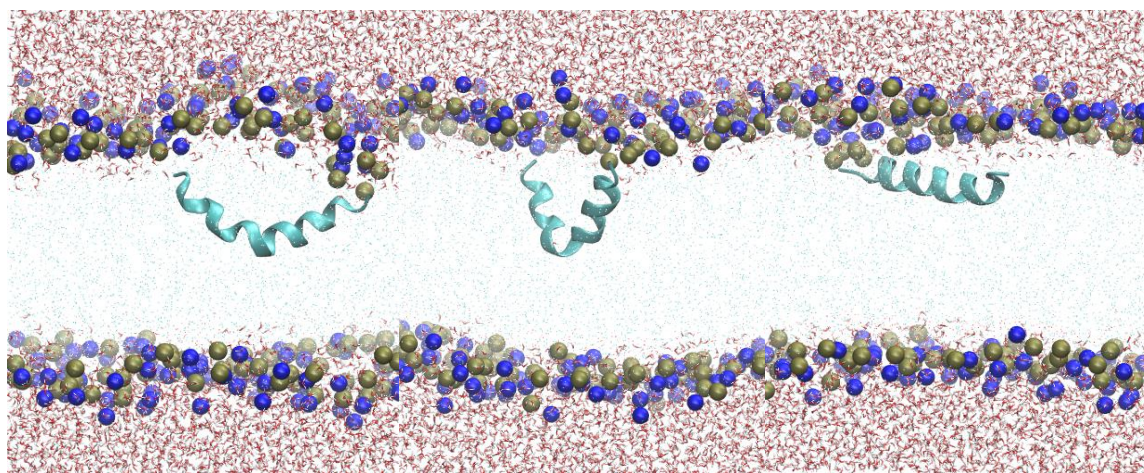
Peptid vložen na počátku vertikálně do POPC										
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10
lokalizace	HM	HM	HM	HM	HM	HM	HM	HM	HM	HM
orientace	V	V	V	V	V	V	H	V	V	H
helicita	A+	A+	A+	N-	A+	N-	A+	A+	A+	A±
průtok vody	A	A	A	(A)	A	(A)	N	N	N	N

**Tab. 15:** Shrnutí vlastností peptidů H1 CTD kolicinu U, které byly vloženy do POPC ve vertikální orientaci. Lokalizace, orientace a helicity peptidu byla určena podle struktury, kterou peptidy zaujímaly v 500 ns. Zisk, resp. ztráta, helikální struktury a průtok molekul vody membrány byl hodnocen na celém intervalu 500ns MD simulace. Vysvětlivky: lokalizace V = vodní fáze, H = POPC hlavičky, HM= POPC hlavičky i řetězce MK, M = hydrofobní oblast membrány (řetězce MK). Orientace V = vertikální, H = horizontální. Helicity A = ano, N = ne, + = helicity získává, - = helicity ztrácí, ± = helicity získává i ztrácí. Průtok vody napříč membránou A = ano, N = ne, AP = silné porušení membrány, (A) = průtok vody, ale daný spíše umělým držením nestrukturovaného peptidu uvnitř membrány skrze jeho umělé konce.

### 5.8.2.2 Chování jednotlivých helixů H2-H10 vložených horizontálně pod POPC hlavičky lipidové membrány

Peptid **H2** v této orientaci navzdory novému předpokladu ztratil svou helikální strukturu. Vystala zde tedy možnost závislosti na interakčním partnerovi v podobě dalšího peptidu. Helix **H3** si sice část helikální strukturu udržel, nicméně také část jeho helikální struktury byla ztracena. To mohlo být ale způsobené vložením pod POPC hlavičky ve špatné orientaci. V MD simulaci, kdy byl tento peptid vložen do membrány níže pod POPC hlavičky membrány, se jeho helicity naopak zvýšila a byla udržena v celém časovém intervalu MD simulace. H3 se totiž stihl pootočit správnou stranou k POPC hlavičkám. Peptid **H4** byl v oblasti POPC hlaviček více helikální než v případě, kdy byl vložen do POPC membráně vertikálně. Zdá se tak, že toto prostředí více vyhovuje jeho sekundární struktuře. Dále je zajímavé, že si peptid **H5** opět zvolil vertikální orientaci. Jeho chování však může být ovlivněno tím, že je jeho sekvence příliš krátká a umělý C-konec působí nepřirozené chování celého H5. Tento peptid má velmi výraznou schopnost membránu „ztenčovat“

v oblasti, kde se zrovna nachází. Také způsobuje průchod vody membránou. Pro další studium se jeví velmi atraktivně. Peptid **H6** není ani v tomto případě helikální. K udržení své struktury patrně nepotřebuje jako interakčního partnera POPC membránu, ale pravděpodobně jiný peptid ve své blízkosti, ev. jinou membránou. MD simulace **H7** v orientaci pod POPC hlavičkami nebyla spočítána, jelikož si H7 v případě vertikálního vložení do POPC membrány tuto orientaci sám zvolil. Při vynuceném vložení hydrofobních helixů H8 a H9 do membrány došlo v případě helixu **H8** k okamžité ztrátě jeho helicity. Peptid **H9** (Obr 71.) si svou helicitu zachoval tím, že jeho vnitřní část struktury byla odpuzena z polární do hydrofobní oblasti POPC. V jedné monovrstvě membrány ho zadržovaly (nejspíše) uměle přidané konce molekuly a zamezovaly jeho překlopení do vertikální orientace. H9 se však do cca 80 ns pootočil do takové orientace, ve které byl posléze schopný se pod POPC hlavičkami vyskytovat a zároveň si zachovat helicitu. Peptid **H10** při tomto počátečním vložení do POPC membrány zaujímal částečně helikální strukturu. Jeho chování bylo obdobné předchozí MD simulaci ve vertikální počáteční orientaci.



**Obr. 71:** Peptid H9 CTD kolicinu U (R-1) v POPC membráně ve 20 ns po startu, 80 ns a při 500 ns MD simulace. Barevné značení: modře atomy dusíku POPC (VDW), zlatě atomy fosforu POPC (VDW), červeně molekuly vody (Bonds), tyrkysově atomy POPC lipidů (Points). Tyrkysovým zobrazením NewCartoon je vyznačen helixů H9 kolicinu U.

Shrnutí jednotlivých vlastností izolovaných helixů H2 až H10 pozorovaných při jejich vložení do membrány POPC v horizontální orientaci pod POPC hlavičky je uvedeno v Tabulce 16.

Peptid vložen na počátku horizontálně do membrány pod POPC hlavičky (k										
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10
lokalizace	H	H	H	H	HM	H	-	H	H	HM
orientace	H	H	H	H	V	H	-	H	H	H
helicitu	A+	N-	A	A	A	N-	-	N-	A	A±
průtok vody	N	N	N	N	A	N	-	N	N	N

**Tab. 16:** Shrnutí vlastností peptidů H1 CTD kolicinu U, které byly vloženy v horizontální orientaci do středu POPC membrány. Vysvětlivky: lokalizace V = vodní fáze, H = POPC hlavičky, HM = POPC hlavičky i řetězce MK, M = hydrofobní oblast membrány (řetězce MK). Orientace V = vertikální, H = horizontální. Helicita A = ano, N = ne, + = helicitu získává, - = helicitu ztrácí, ± = helicitu získává i ztrácí. Průtok vody napříč membránou A = ano, N = ne, silné AP = porušení membrány, A) = průtok vody, ale daný spíše umělým držením nestrukturovaného peptidu uvnitř membrány skrze jeho umělé konce.

### 5.8.2.3 Chování jednotlivých helixů H2-H10 vložený doprostřed lipidové membrány

**H1** se choval obdobně jako v případě, ve kterém byl vložen do POPC membrány pod POPC hlavičky. Z hydrofobní oblasti se rovnoměrně posunul pod polární část. **Helix H2 a H3** se překlopily do pozici vertikální orientace. H2 v tomto případě působil větší průtok molekul vody membránou. H3 se také překlopil do vertikální pozice, a rozrušil membránou - došlo k navázání lipidových hlaviček po jedné jeho straně směrem do středu membrány. **Peptid H4** se v cca 90 ns vysunul z celé membrány do vodní fáze. Ani tam se mu však ve zbylém časovém intervalu 410 ns nepodařilo získat helikální strukturu. **Peptid H6** je poměrně dlouhé sekvence a při takovémto vložení do membrány došlo k interakci jeho N- a C-konce s horním a spodním listem membrány. H6 se tudíž ocitl opět ve vertikální orientaci. **H10** se také překlopil do vertikální orientace v POPC membráně a způsobil v 200 ns její úplné rozrušení a protržení. Jeho helikální struktura byla zachována a s časem simulace se dokonce zvyšovala. Obdobný jev byl pozorován i v MD simulaci za přítomnosti vody u jeho struktury při startu MD. Toto jeho zajímavé chování je ještě porovnáno a popsáno níže. Podobné chování bylo pozorováno i u helixu H3 (a částečně u H2).

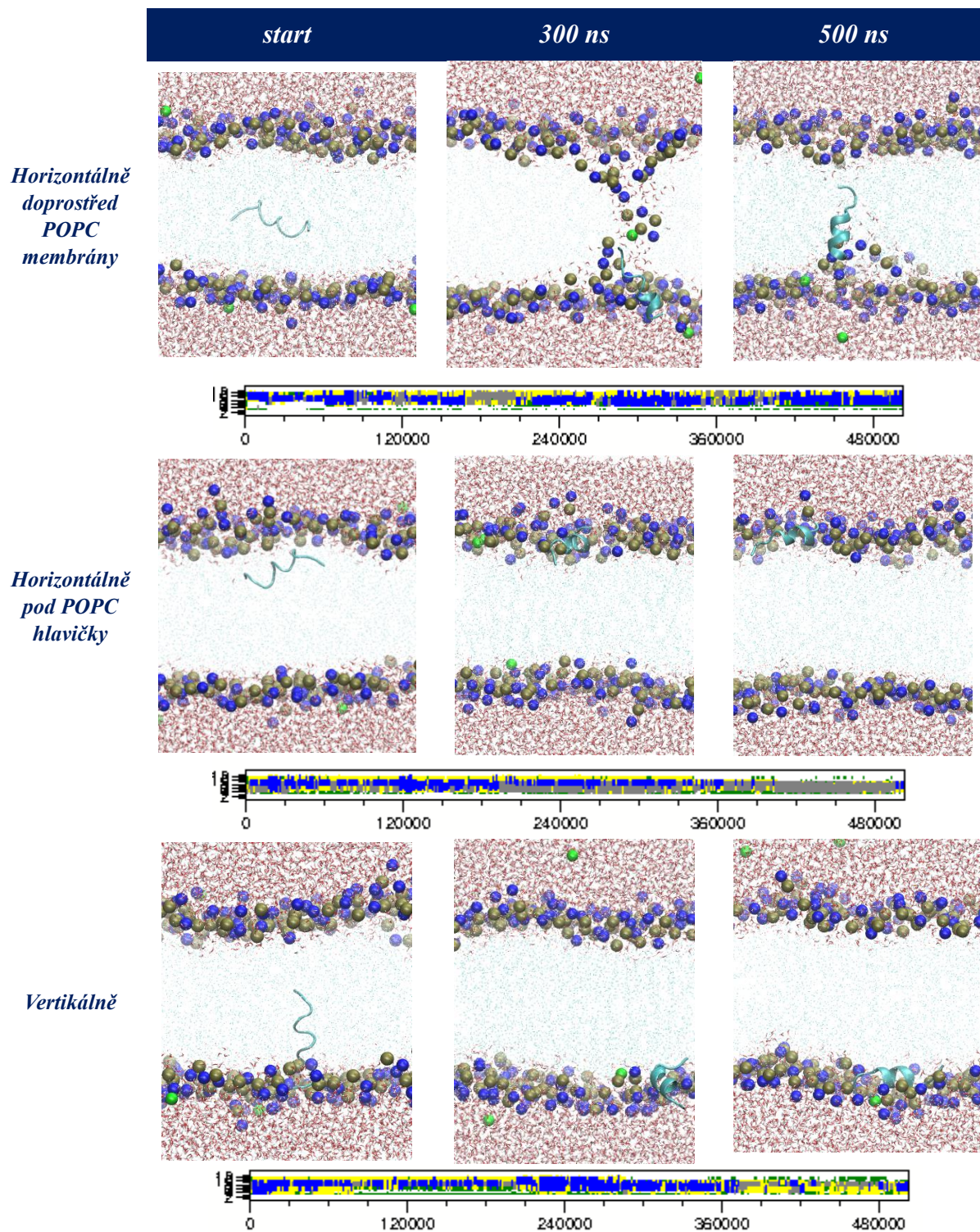
Jednotlivé vlastnosti izolovaných helixů H2 až H10 pozorované při jejich vložení do membrány POPC v horizontální orientaci jsou uvedeny v Tabulce 17.

Peptid vložen na počátku horizontálně doprostřed membrány										
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10
<b>lokazace</b>	H	HM	HM	V	H	HM	H	H	HM	HM
<b>orientace</b>	H	V	V	-	H	V	H	H	V	V
<b>helicitu</b>	A+	N-	A+	N-	N-	N-	A+	N-	A+	A+
<b>průtok vody</b>	N	AP	AP	N	N	(A)	N	N	N	AP

**Tab. 17:** Shrnutí vlastností peptidů H1 CTD kolicinu U, které byly vloženy v horizontální orientaci pod POPC hlavičky membrány. Vysvětlivky: lokalizace V = vodní fáze, H = POPC hlavičky, HM = POPC hlavičky i řetězce MK, M = hydrofobní oblast membrány (řetězce MK). Orientace V = vertikální, H = horizontální. Helicitu A = ano, N = ne, + = helicitu získává, - = helicitu ztrácí. ± = helicitu získává i ztrácí. Průtok vody napříč membránou A = ano, N = ne, AP = silné porušení membrány, A) = průtok vody, ale daný spíše umělým držením nestrukturovaného peptidu uvnitř membrány skrze jeho umělé konce. Otazník znamená, že tato trajektorie zatím nebyla dopočítána.

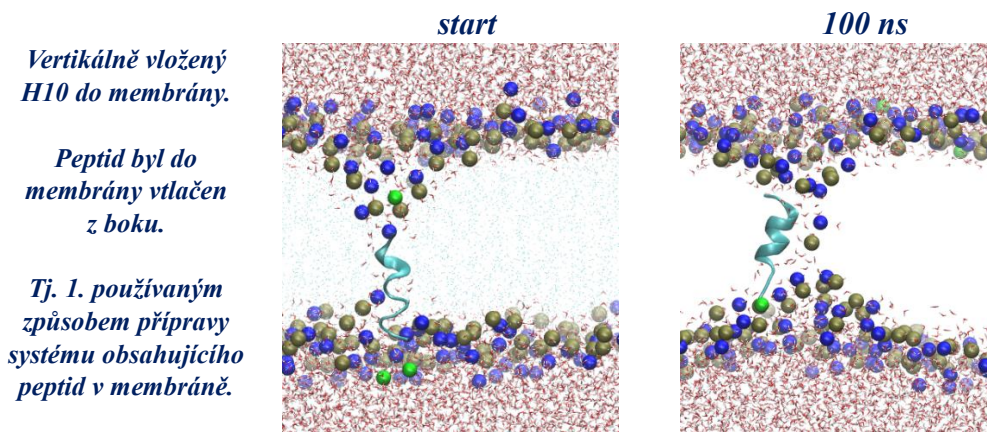
#### 5.8.2.4 Srovnání chování H10 kolicinu při různém vložení do lipidové membrány

Struktura peptidu H10 nabývala  $\alpha$ -helikální, nebo 3-helikální formu. Pouze však v jedné MD simulaci si H10 udržel svou  $\alpha$ -helicitu až do konce 500 ns. Bylo to v situaci, kdy membránu protrhl, penetroval jí a způsobil protékání molekul vody hydrofobní oblastí membrány. Obdobné chování bylo pozorováno i v další MD simulaci, ve které se nacházely molekuly vody v blízkosti jeho struktury při startu MD výpočtu (Obr. 71). Tato MD simulace byla nejdříve považovaná za chybnou. Peptid byl při přípravě systému pro MD simulaci násilně vtlačěn z jedné strany membrány. Tudíž jsem předpokládala jeho uměle vynucené chování, i když se ostatní vtlačené peptidy do membrány tímto způsobem neprojevovaly. Ovšem stabilita jeho helikální struktury v tomto případě působila velice překvapivě. Proto jsem se dále ve své práci na H10 také zaměřila.



**Obr. 71:** Záznam z VMD pro peptid H10 CTD kolicinu U v POPC membráně při různých vstupních orientacích. Obrázek obsahuje také analýzu sekundární struktury (DSSP).

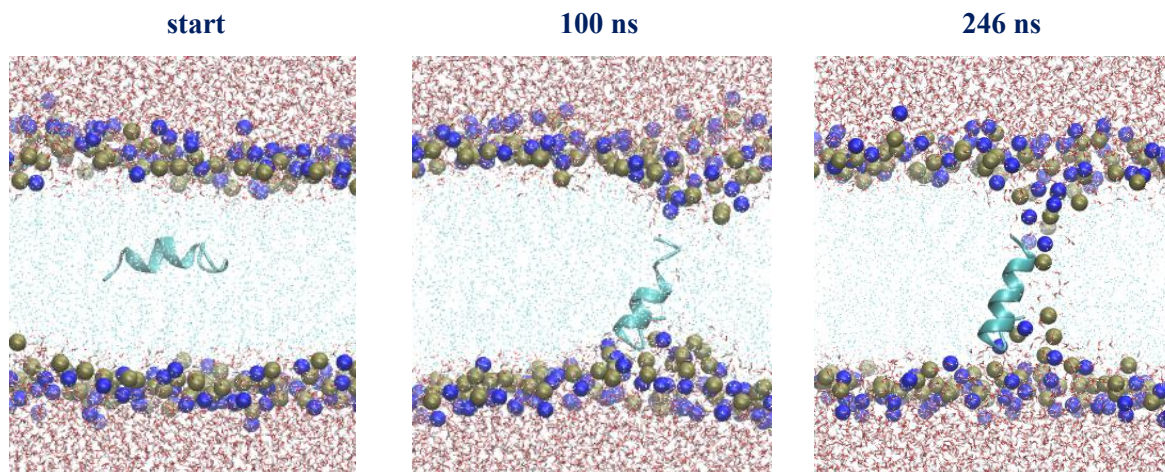
Z výše uvedených obrázků dále vyplývá, že H10 je helikální v oblasti POPC hlaviček. Svou helicitu dokáže v tomto prostředí velmi rychle získat a naopak i opětovně ztratit. Jak už bylo zmíněno výše, jedná se o velmi krátký peptid, který je vysoce nabitý a který navíc obsahuje umělý N-terminální konec. Schopnost penetrovat membránou by tudíž mohla být artefaktem jeho uměle zvolené sekvence. Z tohoto důvodu jsem zvolila k MD simulaci další sekvenci obsahující segment CTD H9-H10.



**Obr. 72:** Peptid H10 CTD kolicinu U (R-4) v POPC membráně při startu MD simulace a v jejích 100 ns. Jeho N-konec, kde by měl reálně pokračovat H9, směřuje nahoru. Barevné značení: modře atomy dusíku POPC (VDW), zlatě atomy fosforu POPC (VDW), červeně molekuly vody (Bonds), tyrkysově atomy POPC lipidů (Points). Tyrkysovým zobrazením NewCartoon je vyznačen helix H10 kolicinu U.

Podobné chování jsem pozorovala i u helixu H3. Vzhledem k tomu, že H7 byl ve vertikálním vložení schopný samovolně změnit orientaci z vertikální na horizontální, mohlo by i chování H3 být teoreticky přirozené.





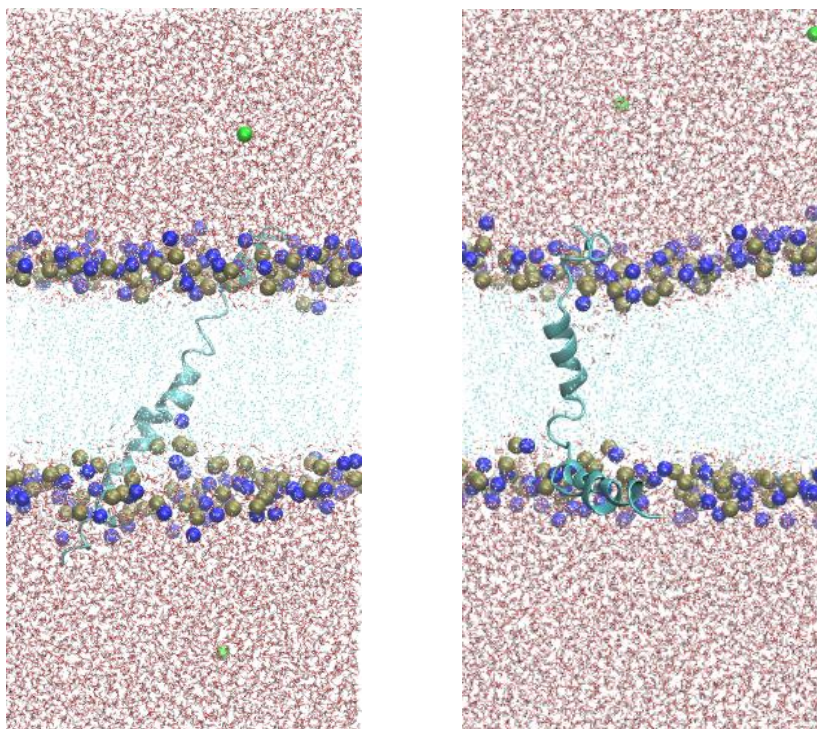
**Obr. 73:** Peptid H3 CTD kolicinu U (R-4) v POPC membráně při startu MD simulace a v jejích 100 ns. Barevné značení: modře atomy dusíku POPC (VDW), zlatě atomy fosforu POPC (VDW), červeně molekuly vody (Bonds), tyrkysově atomy POPC lipidů (Points). Tyrkysovým zobrazením NewCartoon je vyznačen helix H10 kolicinu U.

### 5.8.3 Chování vybraných dvojic peptidů CTD kolicinu U

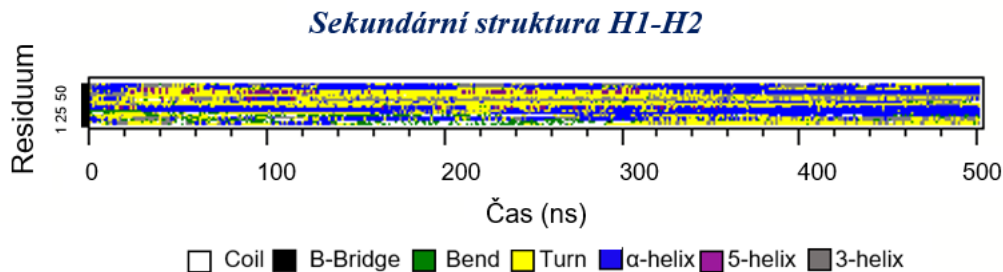
Po dokončení výpočtu MD simulací jednotlivých izolovaných helixů CTD kolicinu U jsem začala pracovat na přípravě systémů, které obsahovaly dva a více helixů současně v membráně.

#### 5.8.3.1 H1-H2 (R-4)

V průběhu MD simulace segmentu obsahujícího helix H1 a H2 (Obr. 74) docházelo k postupnému otočení pozice H2. Původní vertikální pozice ve vodné vrstvě byla pomalu překllopena do horizontální orientace v oblasti POPC hlaviček. H2 tedy nejspíše preferuje oblast membrány. Je však otázka, zda by v delším časovém intervalu MD simulace (1  $\mu$ s) došlo až k jeho úplnému vnoření do hydrofobní oblasti. Z této MD simulace nicméně vyplývá, že je schopný se vyskytovat v polárním prostředí a udržet si svou helicitu za předpokladu, že je vazebně spojený s H1. H1 pravděpodobně zabraňuje jeho helikálnímu rozvolnění na intervalu 500 ns. Záznam o vývoji sekundární struktury tohoto segmentu v MD simulaci je na Obr. 74 a 75.



**Obr. 74:** Peptid H1-H2 CTD kolicinu U (R-4) v POPC membráně při startu a při 500 ns MD simulace. Sekvence odpovídající H1 prochází napříč membránou. Barevné značení: modře atomy dusíku POPC (VDW), zlatě atomy fosforu POPC (VDW), zeleně ionty  $\text{Na}^+$  (VDW), červeně molekuly vody (Bonds), tyrkysově atomy POPC lipidů (Points). Tyrkysovým zobrazením NewCartoon je vyznačen segment CTD o H1-H2.



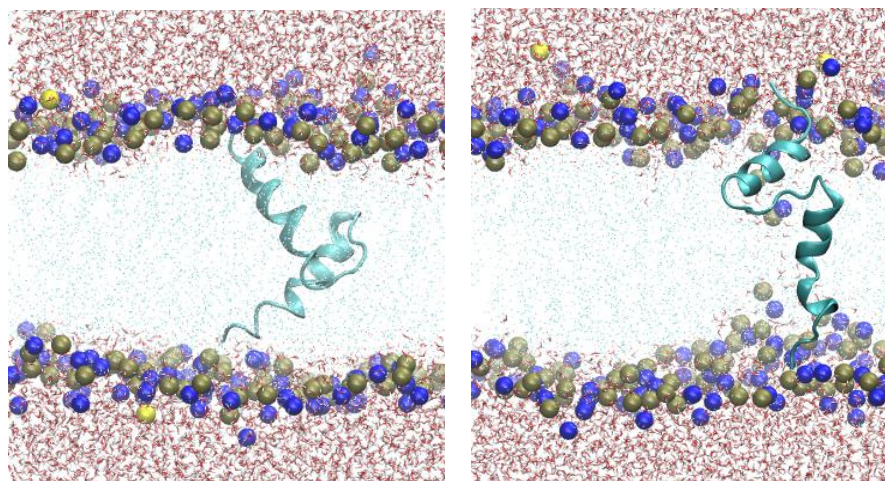
**Obr. 75:** Sekundární struktura peptid H1-H2 CTD kolicinu U (R-4) v POPC membráně.

Z analýzy sekundární struktury (Obr. 75) vyplývá, že čím více se peptid H2 blížil polární oblasti membrány a čím hlouběji do ní pronikal, tím více helikální byla jeho struktura. V průběhu

MD simulace začalo docházet i k helikalizaci H1. Nejvíce helikální byly obě struktury od cca 400 ns. H2 začal helikalizovat jako první. I v této MD simulaci H1-H2 membránou opět protékala voda.

### 5.8.3.2 H2-H3 (R-4)

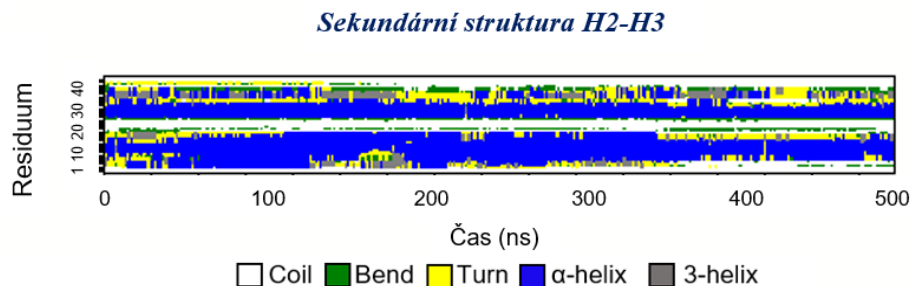
Segment H2-H3 byl vložen do membrány v takové pozici, aby si mohl každý helix, co nejvíce „zvolit“ svou budoucí pozici a orientaci. H2 nakonec opět zvolil polární oblast POPC hlaviček, kde si udržoval svou helicitu. H3 si opětovně zvolil vertikální orientaci a jeho helicity se v průběhu MD simulace zvyšovala. Nicméně je třeba vzít v potaz uměle nabitý C-terminální a N-terminální konec této sekvence. H3 by pravděpodobně neměl sílu na opuštění nabitě monovrstvy svým C-koncem. Zajímavé ovšem ale je, že v této MD simulaci došlo k protržení membrány. Některé lipidy skrze interakci jejich POPC hlaviček se začaly stěhovat za nabitými residui peptidu do hydrofobní oblasti membrány.



**Obr. 76:** Peptid H2-H3 CTD kolicinu U (R-4) v POPC membráně při startu a při 500 ns MD simulace. U horní monovrstvy POPC membrány se nachází H2, u spodní H3. Barevné značení: modře atomy dusíku POPC (VDW), zlatě atomy fosforu POPC (VDW), zeleně ionty  $\text{Na}^+$  (VDW), červeně molekuly vody (Bonds), tyrkysově atomy POPC lipidů (Points). Tyrkysovým zobrazením NewCartoon je vyznačen segment CTD o H2-H3.

Sekundární struktury H2-H3 byly po dobu MD simulace poměrně stabilní, obě části sekvence si udržely helikální segment. Z Obr. 77 je patrný coil, který nemá tendenci měnit

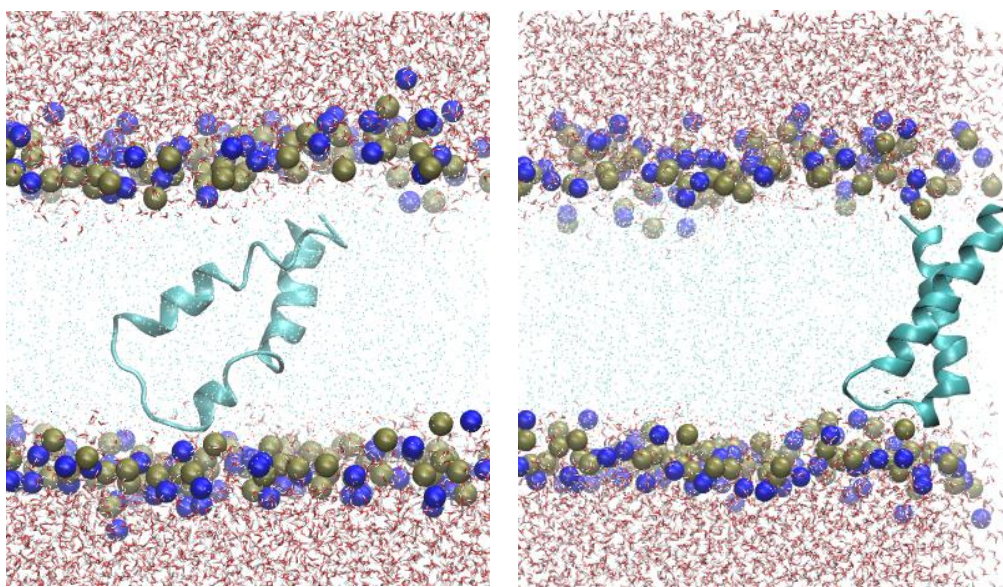
strukturu. U peptidu H2 ale došlo v 360 ns k částečnému povolení helikální struktury. Jednou z možností, proč k tomu mohlo dojít, je navázání POPC hlaviček na coil. Tento jev by mohl působit stericky i elektrostaticky a uvolnit tak helikální otočku H2.



**Obr. 77:** Sekundární struktura peptid H2-H3 CTD kolicinu U (R-4) v POPC membráně.

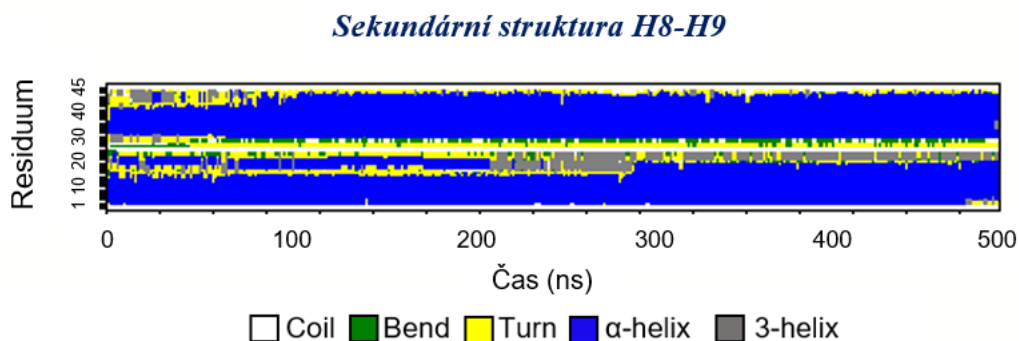
### 5.8.3.3 H8-H9 (R-1)

V průběhu MD simulace došlo k pootočení našikmo vložených helixů H8-H9 v membráně. Oba helixy se orientovaly do vertikální pozice. Obvykle v MD simulaci tvořily „šavli“.



**Obr. 78:** Hydrofobní vlásenka H8-H9 CTD kolicinu U (R-1) v POPC membráně při startu a při 500 ns MD simulace. Helix H8 se nachází na obrázku níže vpravo. Barevné značení: modře atomy dusíku POPC (VDW), zlatě atomy fosforu POPC (VDW), zeleně ionty  $\text{Na}^+$  (VDW), červeně molekuly vody (Bonds), tyrkysově atomy POPC lipidů (Points). Tyrkysovým zobrazením NewCartoon je vyznačen segment CTD o H8-H9.

Sekundární struktura H8-H9 v průběhu MD simulace značně nabývala na stabilitě a helicitě (Obr. 79). Chování tohoto segmentu, obsahujícího helixy H8 a H9, bylo rovnovážné a je v souladu s experimentálními údaji. Toto chování H8-H9 bylo přepokládáno, neboť se jedná o hydrofobní helixy.



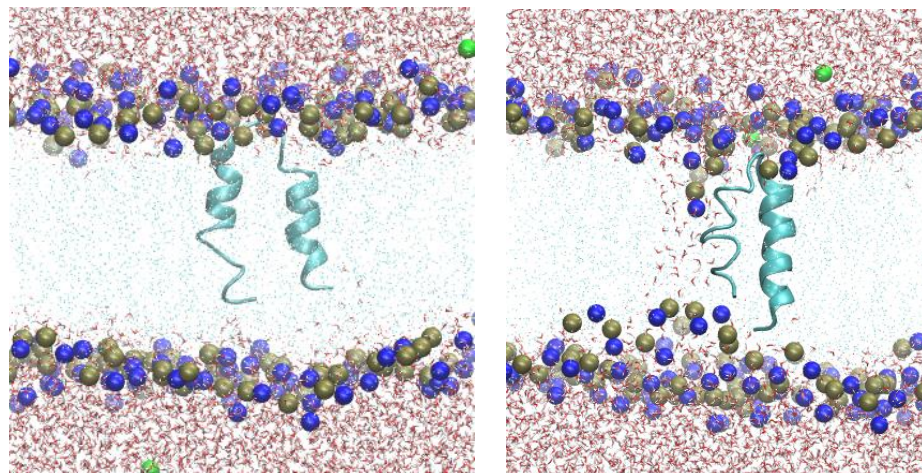
**Obr. 79:** Sekundární struktura peptid H8-H9 CTD kolicinu U (R-1) v POPC membráně.

#### 5.8.3.4 H9-H10 (M-1)

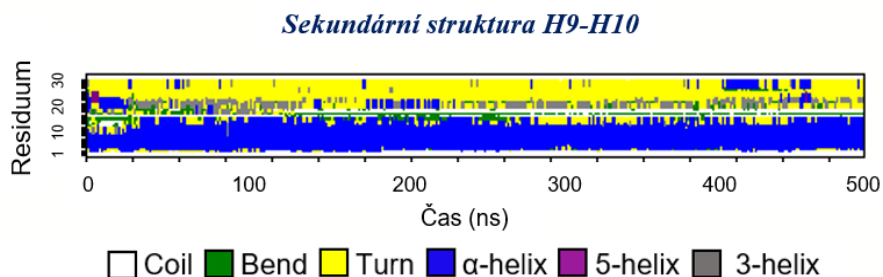
Z vývoje tohoto systému je vidět, jak velmi dokáže peptid H10 ovlivnit strukturu membrány. Již v MD simulaci, ve které byl H10 v membráně samotný, dokázal porušit její strukturu a způsobit silný průtok vody a proiontu  $\text{Na}^+$  napříč membránou. H10 je však krátké sekvence a pokud je sám v membráně POPC, nedokáže se udržet na pevně v jedné monovrstvě. V průběhu simulace byl stažen proudem vody k opačné monovrstvě membrány.

Další zajímavostí bylo, že v MD simulaci, kdy byl H10 lokalizován vertikálně do membrány a v blízkosti molekul vody, vydržel ve stabilní helikální struktuře po celý čas MD simulace. Opět způsobil průnik proiontu  $\text{Na}^+$  membránou. Z MD simulace na Obr. 80 je vidět, že H9 působí jako kotva, která dokáže H10 udržet v jedné monovrstvě membrány. Nicméně je ale také ukázáno, že H10 v této MD simulaci velmi brzy ztratil svou helicitu (Obr. 81). Jeho C-konec by mohl toto chování do jisté míry vynucovat. A to z toho důvodu, že je ovlivněn pravděpodobně umělým N-koncem H9. V této MD simulaci bylo patrné, že tím, jak umělý N-konec stabilně helikální H9 přitahuje C-konec H10, tak jeho strukturu částečně ohýbá. Hydrofobní sekvence H9 by neměla preferovat polární oblast POPC hlaviček nebo molekuly vody v membráně, amfipatická H10 naopak ano. I když jak vyplynulo z MD simulace, H9 je schopný si udržet svou helicitu i v blízkosti POPC hlaviček. A i když by se dalo očekávat, že se tyto dva peptidy budou snažit být od sebe vzdáleny, ve skutečnosti to tak být nemusí. V této MD simulaci jim však v onom vzdálení

patrně zabraňují umělé a nabitě terminální konce. Není jasné, jak moc je chování H10 ovlivněno N-koncem H9. Proto jsem dále připravila systém pro MD simulaci obsahující segment H8-H9-H10 a H7-H8-H9-H10. Důvodem je minimalizace vlivu umělého N-konce této struktury H9-H10.



**Obr. 80:** Segment H9-H10 CTD kolicinu U (M-1) v POPC membráně při startu a při 500 ns MD simulace. Helix H9 se nachází na obr. vpravo. Barevné značení: modře atomy dusíku POPC (VDW), zlatě atomy fosforu POPC (VDW), zeleně ionty  $\text{Na}^+$  (VDW), červeně molekuly vody (Bonds), tyrkysově atomy POPC lipidů (Points). Tyrkysovým zobrazením NewCartoon je vyznačen segment CTD o H9-H10.



**Obr. 81:** Sekundární struktura peptidu H9-109 CTD kolicinu U (M-1) v POPC membráně.

#### 5.8.4 Oligomerizace H1 v POPC membráně

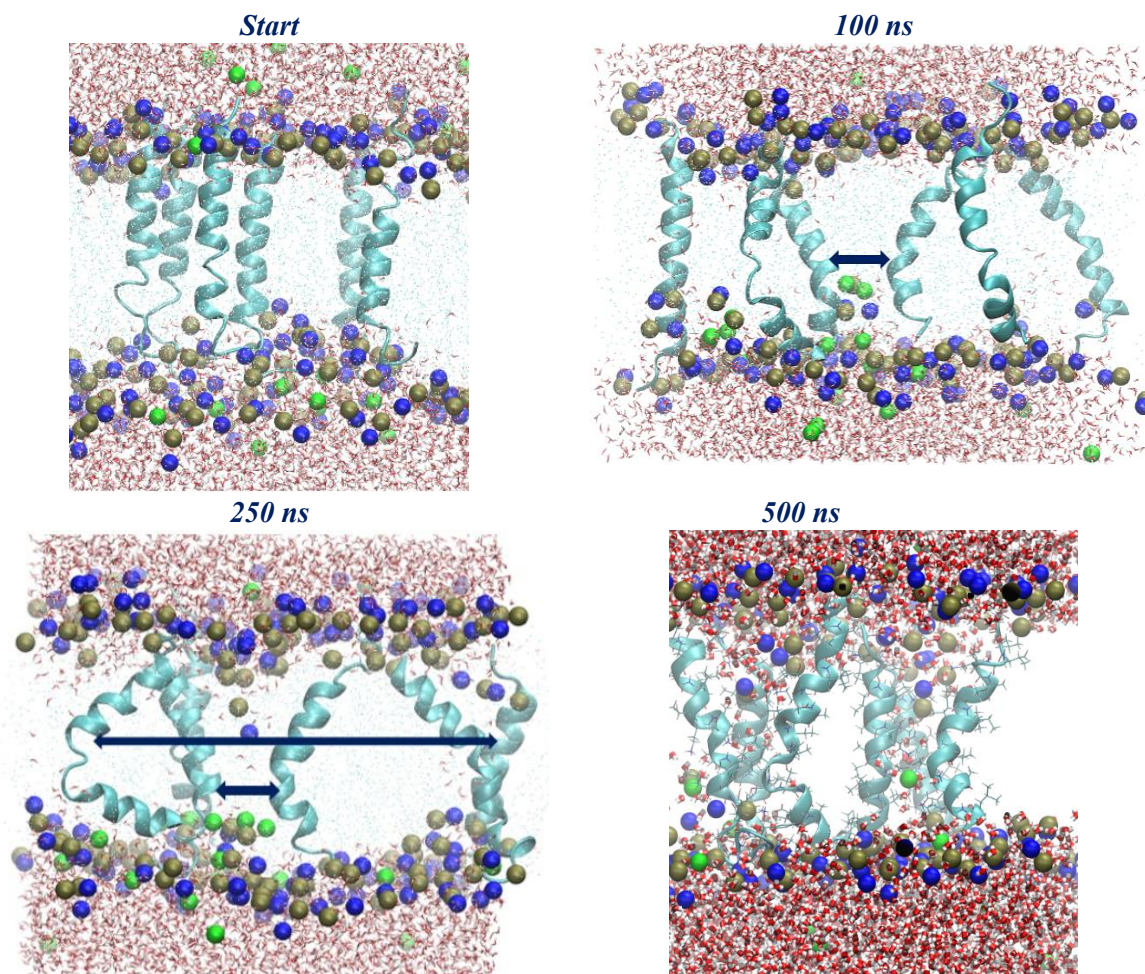
Při měření na černých lipidických membránách jsem pozorovala, že H1 je schopný porotvorné aktivity a možná tvoří větší oligomery. Také jsem měla již k dispozici model M-1 (iTasser). Proto jsem se rozhodla připravit simulační systém obsahující šest peptidů H1 ve standardní POPC membráně.

Prakticky ihned po startu výpočtu trajektorie se projevil zajímavý efekt atrakce sodíkových iontů pouze k jedné straně membrány (Obr. 82). Téměř všechny přidané proionty  $\text{Na}^+$  do systému byly během simulace drženy velmi silně pouze v jedné monovrstvě membrány – tam, kde se vyskytoval C-konec H1 peptidu. Zdá se však, že v této atrakci nepřírozený terminál peptidu nehraje roli. Efekt kumulace protiiontů blízko C-konce struktury H1 pozorovaný pro jednu molekulu H1 je v této simulaci 6x zesílen.

V této MD simulaci byla také velmi brzy pozorována (cca 100 ns) tvorba dimeru H1. Tato struktura měla tvar přesýpacích hodin a byla silně stabilizována interakcí se třemi ionty  $\text{Na}^+$ , které celý dimer prakticky držely pohromadě. Ostatní H1 se v MD simulaci pohybovaly různými směry v membráně, tyto dva helixy byly stabilně u sebe a propouštěly molekuly vody membránou.

V 250 ns simulace byla vytvořena struktura připomínající „trimer“ H1. Tato struktura nebyla pevně fixována  $\text{Na}^+$ . Na Obr. 82. se jedná o interakci tří H1 přes periodické okrajové podmínky boxu. Dá se tedy předpokládat, že H1 je možný schopný tvořit více typů oligomerů a jejich stabilita je daná dostupností přítomných  $\text{Na}^+$ . Další zajímavou událostí v 250 ns této simulace bylo pozorování postupné atrakce lipidových hlaviček směrem do hydrofobní oblasti membrány podle dimeru H1 z jeho N-konce. Lipidové hlavičky začaly postupně vyplňovat „mezery“ mezi těmito peptidy, čímž se zvyšoval průtok vody membránou. Zdá se tedy, že i lipidy POPC membrány jsou schopny stabilizovat pór H1-H1 a možná se ho přímo účastnit. V této simulaci také došlo k tomu, že se jeden H1 postupně elongoval a v 250 ns se prakticky rozdělil na helixy dva. Tím začal lokálně zkracovat membránu. Pozorování chování jednotlivých H1 v této MD simulaci by také mohlo naznačovat, že H1 možná tvoří v lipidové membrány transientní póry.

Na 500 ns došlo k vytvoření stabilních trimeru. V průběhu MD simulace se také začal tvořit tetramer. Z toho důvodu jsem se rozhodla prodloužit časový interval MD simulace na jednu mikrosekundu. Jelikož však MD simulace nebyla ještě dopsána, analýzy tohoto zajímavého chování zatím nebyly vyhodnoceny.



**Obr. 82:** MD simulace šesti molekul H1 kolicinu U. Barevné značení: modře atomy dusíku POPC (VDW), zlatě atomy fosforu POPC (VDW), zeleně ionty  $\text{Na}^+$  (VDW), červeně molekuly vody (Bonds), tyrkysově atomy POPC lipidů (Points). Tyrkysovým zobrazením NewCartoon je vyznačeno šest helixů H1 kolicinu U.

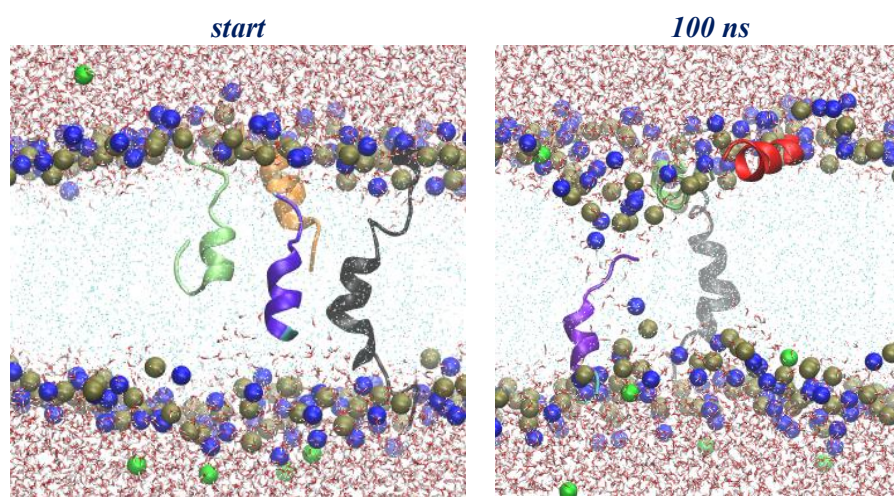
## 5.8.5 Interakce zvolených peptidů CTD kolicinu U v membráně POPC

### 5.8.5.1 H1, H3, H5, H10

Z této MD simulace vyplynulo, že H3 (zeleně) i H5 (červeno-oranžově) jsou schopny v intervalu 100 ns udržovat a zvyšovat svou helikální strukturu i v oblasti pod POPC hlavičkami v horizontální orientaci, kterou si samy zvolily za přítomnosti H1 (černě) a H10 (modro-fialově). H10 se choval standardně – narušoval membránovou strukturu, tentokrát už v 50 ns. H1 začínal vytvářet kink (Obr. 83).



Dále se však ukázalo, že chování těchto peptidů v membráně je pravděpodobně velmi ovlivněné interakcemi jejich umělých N- a C-konců. V polární vrstvě membrány pak docházelo k vzájemným interakcím přes elektronegativní síru u struktur H3 a H5. Obě totiž obsahují methioniny. To mohlo mít efekt na celkovou stabilitu jejich helikální struktury. Ale není zřejmé, zda tyto vazby vznikají přirozeně nebo se začínou vytvářet až po prvotní interakci přitahujících se umělých N- a C-konců molekul. Proto byla tato MD simulace zastavena a dále jsem se rozhodla vložit do membrány celý segment CTD obsahující čtyři po sobě jdoucí helixy v sekvenci. Cílem byla minimalizace vlivu umělého chování způsobeného nepřirozenými terminály molekul.



**Obr. 83:** MD simulace systému obsahující H1, H3, H5, H10. Barevné značení: modře atomy dusíku POPC (VDW), zlatě atomy fosforu POPC (VDW), zeleně ionty  $\text{Na}^+$  (VDW), červeně molekuly vody (Bonds), tyrkysově atomy POPC lipidů (Points). Tyrkysovým zobrazením NewCartoon je vyznačeno 6 helixů H1 kolicinu U.

### 5.8.6 Chování segmentu CTD kolicinu U obsahujícího 4 helixy

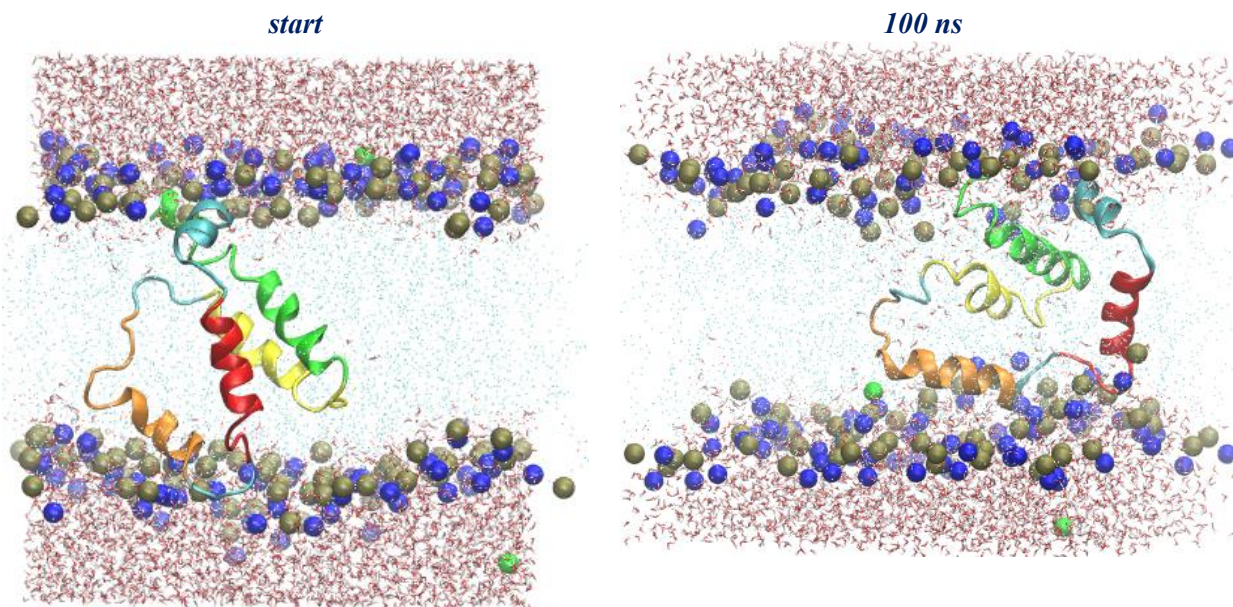
Zatím byly ke studiu zvoleny 3 segmenty: H1-H2-H3-H4, H4-H5-H6-H7 a H7-H8-H9-H10. Nicméně ve své další práci bych ráda prozkoumala chování ještě dalších kombinací, zejména H3-H4-H5-H6 a H4-H5-H6-H7.

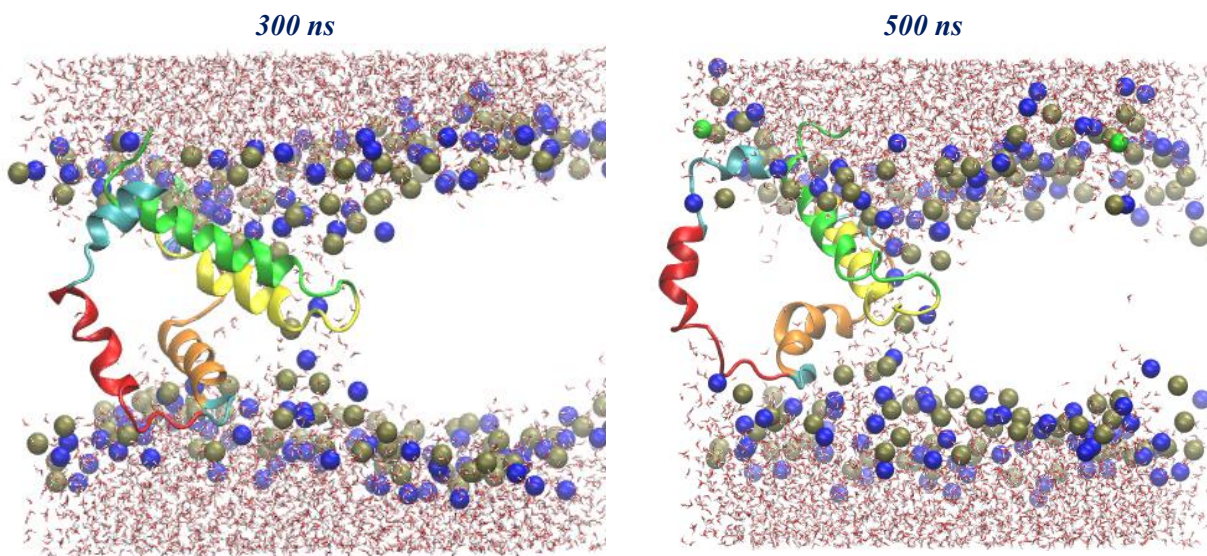
### 5.8.6.1 H1-H2-H3-H4

Záznam z průběhu této MD simulace je na Obr. 84. Vlásačka H1-H2 byla do membrány vložena v nakloněné vertikální orientaci. Překvapivě se ve 100 ns MD simulace dostala do takové pozice, kdy byl helix H1 (zeleně) lokalizován částečně pod POPC hlavičkami jedné monovrstvy a struktura H2 (žlutě) se k němu postupně přibližovala. Všechny helixy si udržely svou helikální strukturu a v průběhu simulace se jejich helicita zvyšovala (H3, oranžově). Výjimkou je helix H4 (červeně), ten ztratil jednu helikální otočku. Nicméně oproti simulacím, ve kterých byl studován samostatně, byla jeho sekundární struktura zachována.

Zajímavý je v této simulaci efekt horizontálního vložení vlásačky H1-H2 do membrány. Do 300 ns byla totiž membrána prakticky rozpůlena ve dvě. 500 ns pór byl pak ještě mnohem většího rozměru. Takto vložena vlásačka H1-H2, která si sama zvolila lokalizaci, toroidně zakřivila velkou část membrány. To přináší další nečekanou otázku ohledně umístění těchto helixů do membrány. Přepokládala jsem totiž, že si H1 zvolí vertikální orientaci s náklonem. Je tedy možné, aby helixy tvořící pór v membráně ležely takto našikmo? Teoreticky by to mohlo vést k póru o většímu průměru. Zároveň ale pozorování z této simulace naznačuje, že pokud by helixy H1 a H2 měly procházet transmembránově, tak nejspíše společně.

MD simulace zatím nebyla dopočítána přes celý interval (1 mikrosekunda), z toho důvodu zde není uvedena její analýza.





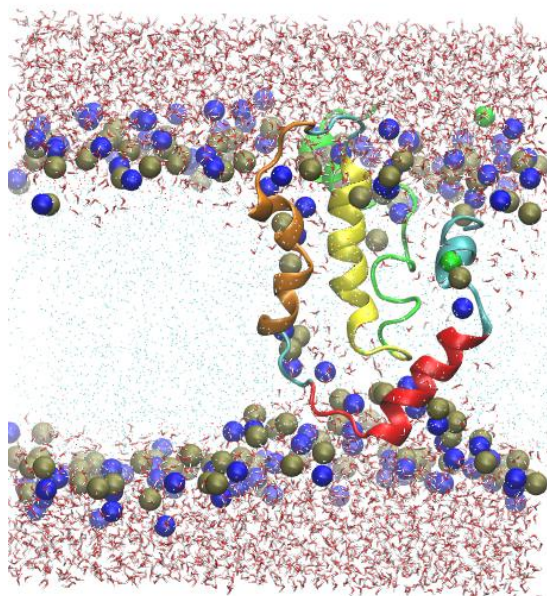
**Obr. 84:** MD simulace vloženého segmentu H1-H2-H3-H4. Barevné značení: modře atomy dusíku POPC (VDW), zlatě atomy fosforu POPC (VDW), zeleně ionty  $\text{Na}^+$  (VDW), červeně molekuly vody (Bonds), tyrkysově atomy POPC lipidů (Points). Tyrkysovým zobrazením NewCartoon je vyznačen celý segment CTD. Dále jsou vyznačeny struktury o sekvenci odpovídající H1 (černě), H2 (hnědozeleně), H3 (světle zeleně), H4 (žlutě).

### 5.8.6.2 H1-H2-H3-H4 – verze 2

Vzhledem k tomu, že si vlásenka H1-H2 zvolila v membráně horizontální orientaci jsem se rozhodla spustit simulaci znovu - tentokrát s vlásenkou H1-H2 vloženou vertikálně (Obr. 85). Tato orientace vyvolala velmi brzo (cca 50 -100 ns) přesuny v membránových lipidech. Lipidové hlavičky začaly „šplhat“ po H3 helixu (oranžově), jako v případě jeho MD simulace horizontálně vloženého do středu membrány. Zároveň docházelo k pronikání protiiontů  $\text{Na}^+$  membránou.

Lipidové hlavičky v 250 ns simulace začaly vyplňovat po obvodu spoje jednotlivých helixů H3 a H2 (žlutě). Dá se očekávat, že se lipidové hlavičky budou vázat i na H1 (zeleně). Ten však v začátku MD simulaci ztratil svou helikální strukturu. To bylo způsobenou mou chybou – vložila jsem transmembránově příliš velký segment a N-konec peptidu H1 začal „cítit“ polární oblast membrány na opačné straně boxu přes periodické okrajové podmínky. H1 byl proto nečekaně částečně vysunut z membrány a ztratil tím nejspíše svou helicitu. V současnosti probíhá MD simulace tohoto segmentu ve větší membráně, nicméně její výpočet zabere příliš mnoho času. Proto jsem se rozhodla dát do této práce i záznam z této simulaci, neboť přímo ukazuje na pórtvorné

chování segmentu H2 a H3 a jeho schopnost zakřivit membránu. Také se zde objevuje vůbec poprvé i jistý náznak možnosti pro uplatnění helixu H4 na stavbě póru. Ale MD simulace zatím nebyla dopočítána přes celý interval, z toho důvodu zde není uvedena její analýza.



**Obr. 85:** MD simulace vertikálně vloženého segmentu H1-H2-H3-H4 v 200 ns. Barevné značení: modře atomy dusíku POPC (VDW), zlatě atomy fosforu POPC (VDW), zeleně ionty  $\text{Na}^+$  (VDW), červeně molekuly vody (Bonds), tyrkysově atomy POPC lipidů (Points). Tyrkysovým zobrazením NewCartoon je vyznačen celý segment CTD. Dále jsou vyznačeny struktury o sekvenci odpovídající H1 (černě), H2 (hnědozeleně), H3 (světle zeleně), H4 (žlutě).

### 5.8.6.3 H4-H5-H6-H7

Dále jsem zkoumala segment CTD kolicinu U obsahující helixy H4 (červeně), H5 (oranžově), H6 (žlutě), H7 (zeleně) (Obr.86). Helixy H4 a H6 byly ve vstupu lokalizovány k povrchu membrány – vycházela jsem z jejich chování v simulacích, kde byly studovány jako izolované jednotky. V tomto případě H4 opět ztratil svou helicitu, ale rozprostřel se zvláštním způsobem po membráně.

H6 sice také ztratil na prvních 100 ns helicitu, ale jeho chování je jinak velmi zajímavé. Helix H5, který ve všech simulacích, kde byl studován samostatně, zvolil vertikální orientaci. Nicméně k tomuto jeho chování jsem měla jisto nedůvěru kvůli možnému vlivu jeho nepřírozeného konce (i když H7 se takto neprojevoval). Nicméně zde je dokázáno, že H5 opět volí vertikální

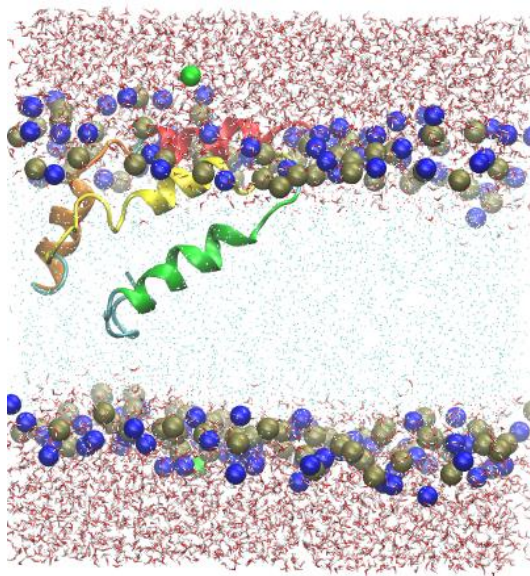
orientaci a silou, kterou je přitahován k opačné monovrstvě membrány, táhne také celý helix H6 do vnitřku membrány. A ten na 300 ns začíná poprvé v MD simulaci helikalizovat. Nicméně ne jako jeden helix – ale jako dvě helikální jednotky z obou stran struktury. Nestrukturovaná část sekvence před H6 v solubilním stavu, zde helikalizuje a doplňuje část helikální oblasti H6. Tzn. že ke všem MD simulacím H6 peptidu kolicinu U byla nejspíše zvolena špatná sekvence. To vysvětluje, proč peptid nebylo možné udržet v helikálním stavu v žádné orientaci v membráně, ani ve vodě.

Ještě podivuhodnější je, že tak krátký helix jako je H5 a následně nově vytvořená část H6 jsou schopny vyvolat velké lokální zúžení membrány (viz 500 ns). A překvapivé také je, že helix H7 se obdobně jako H6 rozdělí na dva, v tomto případě téměř na pravoúhle orientované helixy. Dochází k vytvoření helikální sekundární struktury, která v solubilní stavu dříve helikální vůbec nebyla, a naopak je ztracena helikální struktura odpovídající solubilnímu stavu.

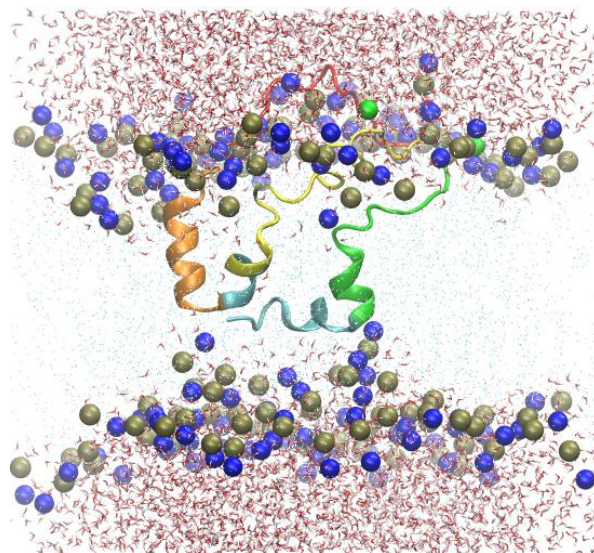
Další poměrně nečekaná věc je, že uspořádání těchto helixů v 500 ns v membráně tvoří „stěnu“ s třemi otvory pohledem „shora“. Do některých se v MD simulaci vázaly lipidové hlavičky. H4 se zde pak uplatňuje jako „klenba“.

Je zřejmé, že zde k tvorbě toroidního zakřivení na 500 ns nedošlo. Nicméně se zdá, že k tomu schyluje. Proto jsem se dále rozhodla, že všechny MD simulace segmentů CTD budu dále studovat na časovém intervalu 1  $\mu$ s. Nicméně v této závěrečné práci je zobrazeno pouze prvních 500 ns. Analýzy zatím nebyly vyhotoveny.

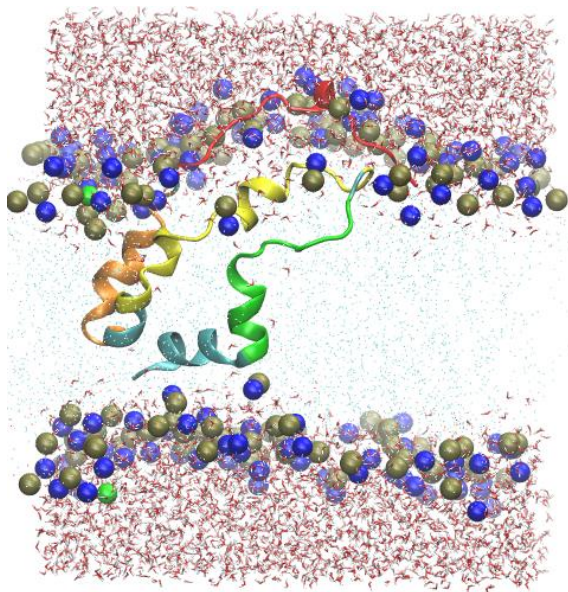
*start*



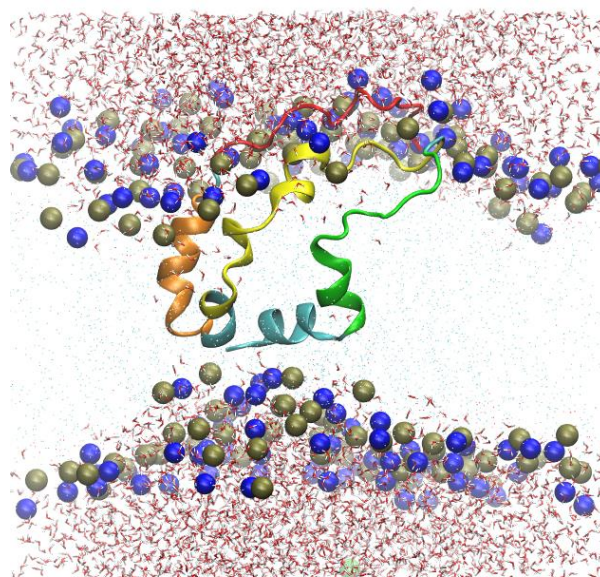
*100 ns*



*300 ns*

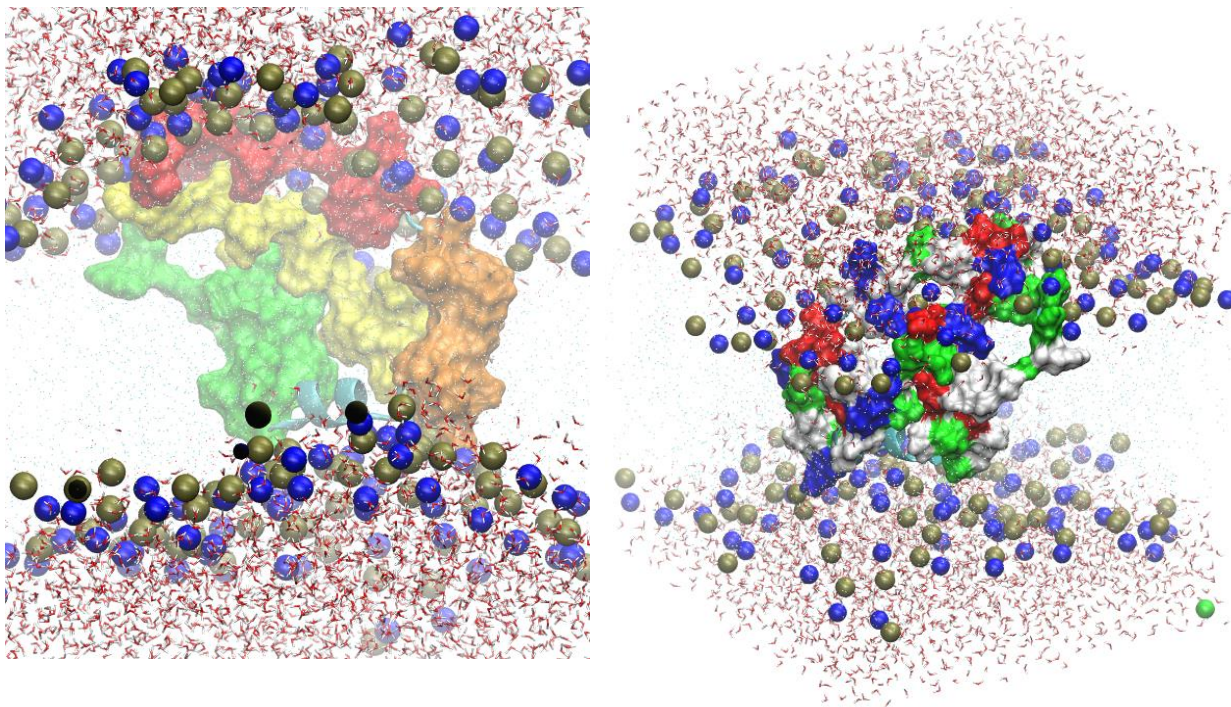


*500 ns*



*500 ns*

*500 ns (2) (pohled shora)*



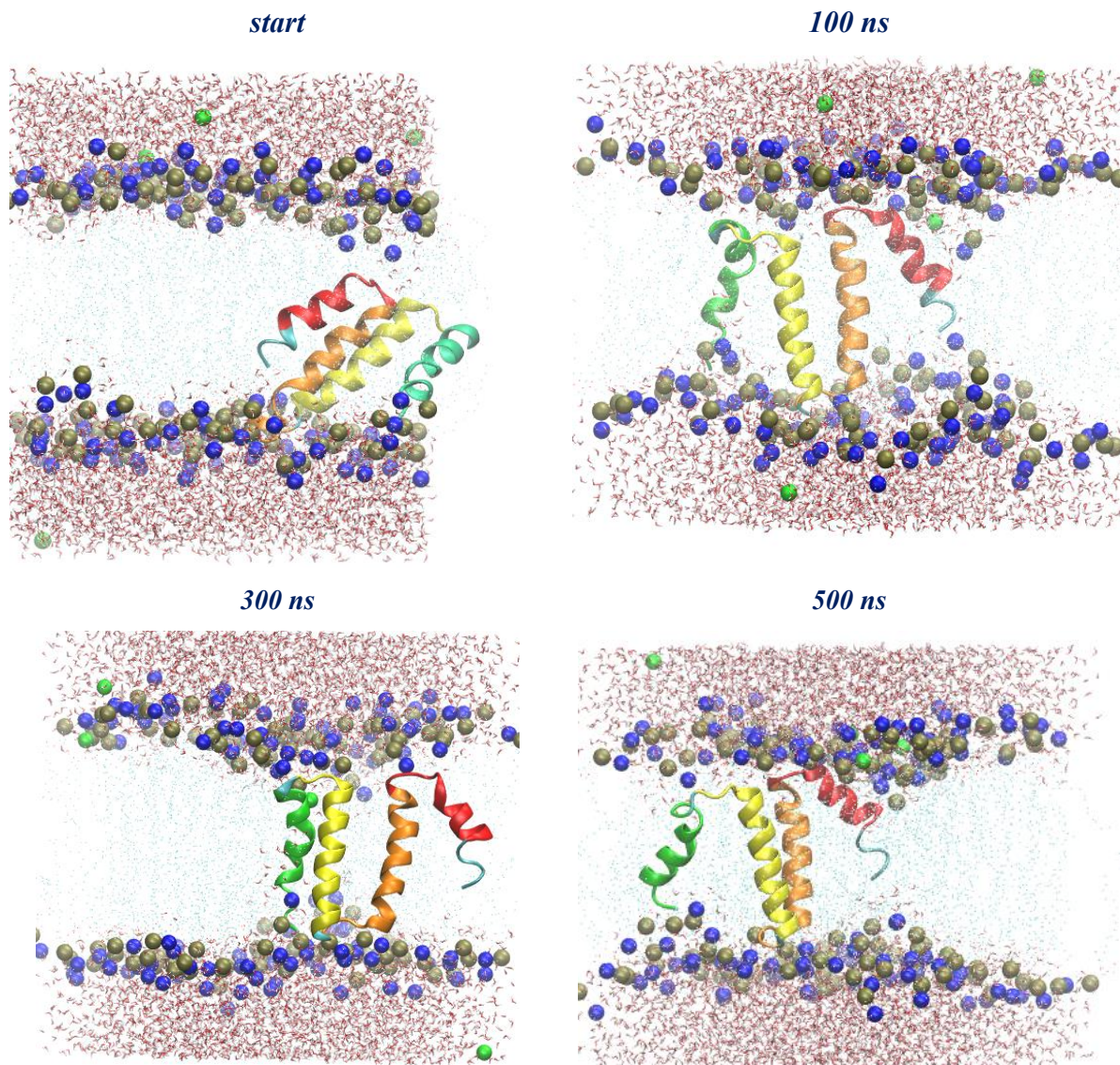
**Obr. 85:** MD simulace vertikálně vloženého segmentu H4-52-H6-H7. Barevné značení: modře atomy dusíku POPC (VDW), zlatě atomy fosforu POPC (VDW), zeleně ionty  $\text{Na}^+$  (VDW), červeně molekuly vody (Bonds), tyrkysově atomy POPC lipidů (Points). Tyrkysovým zobrazením NewCartoon je vyznačen celý segment CTD. Dále jsou vyznačeny struktury o sekvenci odpovídající H4 (žlutá), H5 (oranžová), H6 (tmavě růžová), H7 (světle růžová). 500 ns pohled z boku a pohled shora.

#### 5.8.6.4 H7-H8-H9-H10

K ověření vlivu H10 na membránu jsem ke studiu použila tento segment CTD kolicinu U (Obr. 86). Hydrofobní vlásenka si zvolila vertikální orientaci i s navázanými helixy H7 a H10 po stranách. Porotvorný efekt H10 se postupně objevoval a zanikal. Nicméně tento helix zůstal po celou dobu MD simulace helikální. Ke konci simulace se jeho přirozený C-konec začal mírně rozmotávat. To je však pravděpodobně způsobené přitahujícími lipidovými hlavičkami. Dá se očekávat, že v navazujícím běhu MD simulace dojde k opětovnému vytvoření póru tímto H10. H10 také projevuje chování schopné lokálně „ztenčit“ membránu.

H7 se v této simulaci projevuje stabilně helikálně. Opět ho tvoří dvě helikální oblasti, které mají tendenci být na sebe spíše kolmé. Také se zde projevuje vliv dvou vazebných míst pro  $\text{Na}^+$  u N-konce peptidu H7. tyto ionty byly s největší pravděpodobností lokalizovány právě přímo na

místě, nebo v jeho okolí. Nicméně se vždy dokázaly od H7 odpoutat a vrátit zpět do vodné fáze, tzn. že byly stále v rovnováze.



**Obr. 86:** Barevné značení: modře atomy dusíku POPC (VDW), zlatě atomy fosforu POPC (VDW), zeleně ionty  $\text{Na}^+$  (VDW), červeně molekuly vody (Bonds), tyrkysově atomy POPC lipidů (Points). Tyrkysovým zobrazením NewCartoon je vyznačen celý segment CTD. Dále jsou vyznačeny struktury o sekvenci odpovídající H7 (světle růžová), H8 (světle fialová), H9 (ledová modrá), H10 (tmavě modrá).



## 5.9 Chování celé CTD kolicinu U a A ve vodě při 310 K

Kromě segmentů CTD jsem začala v této práci studovat také celé CTD kolicinů. Začala jsem jejich studiem ve vodě. Ale i MD simulace celé CTD domény rozpuštěné ve vodě je velmi výpočetně náročná. Z toho důvodu byly vypočítány zatím pouze 3 CTD – kolicinu A (model 1COL, chain A) a U zastoupeného modely R-1 a M-1. Čas těchto MD simulací byl zatím pouze 200 ns vzhledem k již zmíněné vysoké časové náročnosti. Dalším důvodem pak byly 200ns MD simulace jednotlivých peptidů H1 – H10 kolicinu U ve vodě (Tab. 18). Vypočítaná sekundární struktura těchto struktur je uvedena na Obr. 87.

**CTD kolicinu A** byla k MD simulaci zvolena kvůli příbuznosti s kolicinem U, značnému množství dostupných experimentálních dat, a v MD viditelné schopnosti H1 ničit funkci lipidové dvojvrstvy. Tato rozpuštěná struktura v MD simulaci při 310 K nabývala pouze strukturních prvků jako je „coil, bend, turn,  $\alpha$ -helix, 3-helix“. Její chování ve vodě bylo velmi rovnovážné. Helix H1 a H2 nebyly odděleny tak velkou nestrukturovanou oblastí jako v případě modelu kolicinu U.

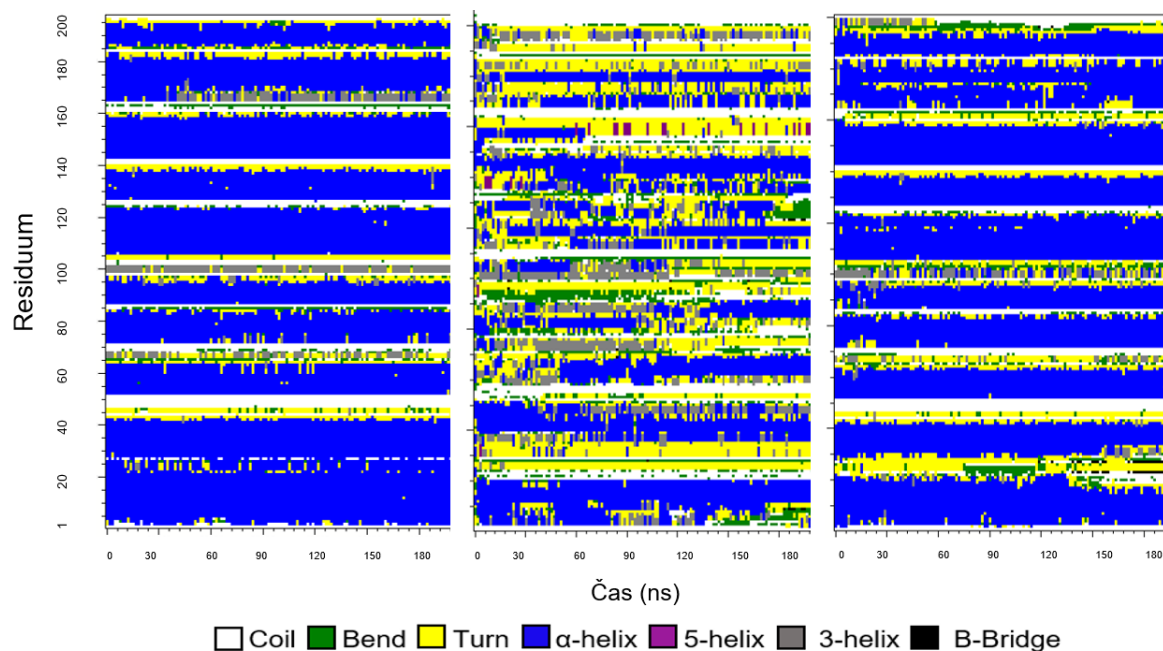
Struktura CTD kolicinu U vygenerovaná softwarem Rosetta (**R-1**) byla namodelována již se zohledněním hydrofobního prostředí membrány. R-1 je jedna z možných struktur, kterou by mohla CTD kolicinu U zaujímat v lipidové membráně. Nejednalo se o kompaktní strukturu jako v případě CTD kolicinu A a U z modelu M-1. Vůči molekulám vody byly v této struktuře nejvíce náchylné helikální struktury H5, H8 a H10. H3 a H7 naopak postupně helikalizovaly.

Chování modelu **M-1** (iTasser) při 310 K v čisté vodě s protioionty bylo velmi podobné chování struktury 1COL. To mj. také značí, že se jedná o kvalitní model vhodný k dalšímu studiu. Helixy H3-H10 modelu M-1 se chovaly téměř totožně ve vodě jako helixy H3-H10 1COL. Jediný velký patrný rozdíl v chování mezi M-1 a 1-COL je v nestrukturované oblasti mezi helixem H1 a H2. Se zohledněním předchozích MD simulací, by však tento jev mohl být kolicinu U přirozený. Odpověď na tuto otázku by mohly poskytnout další MD simulace publikovaných celých CTD ostatních PK.

Ve své další navazující práci se chci věnovat právě i simulacím celých CTD PK v lipidových membránách. Jednalo by se o velmi výpočetně náročné simulace. Nicméně už v průběhu této práce byla připravena umělá membrána *E.coli* v takové velikosti, aby k ní bylo možné přidat celou CTD. Byla připravena pro sledování membránové inkorporace CTD, u které na základě experimentálních dat předpokládám, že vyžaduje negativní náboj na povrchu membrány. Pro sledování chování vložených CTD do membrány bude zvolena nejspíše membrána POPC.

Struktury	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10
Samostatné peptidy CTD kolicinu U	↕	↑	↕	↓	↓	↓	↕	↓	↓	↕
CTD R-4	↕	↑	↑	↑	↓	↕	↑	↓	↕	↓
CTD M-1	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
CTD A (1COL, A)	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=

**Tab. 18:** Srovnání vývoje helicity struktury peptidů H1-H10, kterou zaujímají samostatně v roztoku, nebo jakou součást CTD. MD simulace ve vodě probíhaly v intervalu 200 ns a 310 K. Vysvětlivky: ↑ helicity vzrůstá, ↓ helicity klesá, ↕ helicity vzrůstá i klesá, = struktura je helikální a v průběhu MD simulace se výrazně nemění.



**Obr. 87:** Sekundární struktura peptidu kolicinu A (model 1COL, chain A) a U (model R-1 a M-1).

## 6 Diskuze a závěr

Podle dostupné literatury jsou kolicinové kanály záhadou. A to jak z hlediska jejich struktury, tak mechanismu účinku. Tato práce měla za úkol podat další informace o možné struktuře CTD kolicinu U v lipidové membráně.

### 6.1 Úloha H1 na stavbě póru

V této práci bylo zjištěno, že izolovaný helix H1 kolicinu U je schopný narušit lipidovou membránu POPC v pH 7 takovým způsobem, že jí protéká voda. Stejný efekt byl pozorován i v případě použití membrány o lipidovém složení membrány *E. coli*. V obou použitých membránách peptid H1 zaujímal vertikální orientaci a helikální strukturu. Jeho sekundární struktura byla v lipidové dvojvrstvě stabilizována protékajícími molekulami vody podél jeho jednoho povrchu. Z toho lze usuzovat, že se tento helix bude účastnit ve stavbě membránového póru vytvářeného CTD kolicinu U.

Také jsem zjistila, že struktura H1 kolicinu U v lipidové membráně vytváří blízko svého C-konce zalomení (kink, v oblasti SER23 kolicinu U). Tato vlastnost je společná všem helixům H1 publikovaných krystalografických struktur CTD pórotvorných kolicinů. Výjimkou je helix H1 kolicinu Ia, který tento kink tvořil po velmi krátký čas MD simulace a H1 kolicinu A, který zjevné zalomení v průběhu MD simulace také „ztratil“.

Oba dva tyto helixy způsobily v 500ns MD simulaci toroidní zakřivení lipidové membrány a působily pórotvorně. Jejich chování podporuje model struktury CTD v lipidové membráně navržený Sobkem et al. 2004. A možná vysvětluje další experimentální pozorování v pracích jako např. Slatin et al. (2004) týkající se existence dvou různých vodivostních stavů kolicinu Ia a A. Autoři si změnu v zaznamenané vodivosti kanálů vysvětlují transmembránovou lokalizací H1 a v případě kolicinu Ia - jeho následným přesunutím do cytosolu. H1 kolicinu Ia v MD simulaci projevil vzhledem ke všem ostatním simulovaným helixům nejvyšší potenciál pro vysunutí směrem z POPC membrány do vodné fáze. Také H1 kolicinu A svou pozici (vzhledem ke vstupní membránové lokalizaci) změnil podobným způsobem. Podařilo se mi tedy u nich identifikovat jev v chování, který k způsoboval silné narušení lipidové dvojvrstvy. Všechny H1 různých kolicinů byly vloženy do lipidové dvojvrstvy v cca stejné pozici vůči membráně. Helixy H1 kolicinu A a Ia svou vstupní pozici změnily a v membráně se posunuly takovým způsobem, že jejich residua jako LYS a GLU se ocitla hlouběji v hydrofobní oblasti, než tomu bylo u ostatních helixů H1. Toto

způsobilo elektrostatické přitažení lipidových hlaviček směrem do středu membrány a následnou tvorbu toroidního zakřivení membrány. Toto zakřivení bylo vedeno po jednom povrchu helixu H1 kolicinu A a Ia a způsobilo destrukci membrány. V případě H1 kolicinu A lipidovou dvojvrstvou nepronikaly jen molekuly vody, ale i ionty  $\text{Na}^+$ . Tím, jak byly tyto peptidy H1 staženy směrem k jedné monovrstvě membrány, tak zároveň jejich struktury ztratily zalomení. Residua jemu odpovídající již lokalizována v hydrofobní vrstvě membrány, nýbrž byla v kontaktu s POPC hlavičkami a vodní fází nad membránou.

H1 kolicinu A projevil v MD silnější pórotvornou aktivitu než H1 kolicinu Ia. Myslím, že efekt pórotvornosti by mohl být pozorovatelný v MD simulaci i u ostatních H1 v případě snížení pH. To bude třeba však ještě ověřit v následných MD simulacích a ev. v měřeních na BLM. Kolicinové kanály jsou obecně aktivnější při nižším pH. Myslím si, že pokud má takový helix jako je H1 s nabitými residui projít v účinném čase v pH 7 skrze polární oblast membrány do hydrofobní, tak z hlediska termodynamiky se jedná o velmi nevýhodný proces. V případě protonování těchto residuí a membránových lipidů (nízké pH) už tento přechod nemusí být tak energeticky náročný. Z toho důvodu chci ve své další práci změnit protonační stav studovaných peptidů H1 a sledovat jejich chování. Možná se poté ukáže, že i H1 kolicinu U bude schopný silněji narušit lipidovou membránu na 500 ns intervalu MD simulace - bude se moci posunout v membráně ve směru osy z jako H1 kolicinu A a Ia. Možná by to mohlo vysvětlit i experimentální pozorování chování kolicinových kanálů v zavislosti na pH roztoku na BLM. Možná to bude odpovídat kinetickým studiím. Možná to souvisí i s případnou oligomerizací H1 (či celých CTD) a „pevnosti“ strukturního propojení těchto oligomerů.

Dále se mi podařilo identifikovat vazebná místa pro ionty  $\text{Na}^+$  na povrchu struktury H1 (není ukázáno), které do MD simulace byly přidávány většinou jako protiionty. Ionty  $\text{Na}^+$  se se v průběhu MD simulace vázaly s velmi vysokou pravděpodobností do určitých žlábků na povrchu struktury H1 téměř všech studovaných kolicinů. U H1 kolicinu Ia jsem to zatím nepotvrdila z důvodu, že MD simulace tohoto helixu proběhla bez přidání protiiontů  $\text{Na}^+$ . H1 kolicinu Ia byl elektroneutrální.

Obvykle je vazebné místo lokalizováno v blízkosti C-konce helixu v oblasti kinku. Ale např. H1 kolicinu N obsahuje vazebné místo i z N-konce téměř v blízkosti středu hydrofobní oblasti lipidové dvojvrstvy. Zjistila jsem také, že počet vazebných míst pro ionty  $\text{Na}^+$  není u všech helixů H1 pórotvorných kolicinů totožný. Předpokládám, že by tato skutečnost mohla souviset s iontovou

selektivitou kolicinových kanálů. Pokud by se v následujících MD simulacích těchto helixů s různými ionty (o koncentraci odpovídající experimentálním měřením na BLM) potvrdila specifická k určitým iontům, indikovalo by to, že iontová selektivita je možná. Dále by se tím mohl také objasnit jev stabilizace některých kolicinových kanálů  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Na toto studium bych se chtěla zaměřit ve své další práci. Plánuji provést MD simulace s různými ionty o koncentraci mimikující experimentálně používanou koncentraci daných iontů a stanovit míru pravděpodobnosti výskytu různých iontů na těchto místech struktury H1 kolicinů. V naší laboratoři vznikla práce zkoumající iontovou selektivitu kolicinu U. Volba iontů k těmto MD simulacím bude tedy vycházet z druhu iontů používaných v experimentální práci Mgr. Terezy Dolejšové.

## 6.2 Oligomerizace H1 – teorie a experiment

Pomocí MD simulací jsem zjistila, že peptid H1 kolicinu U je schopný vytvářet přechodné dimery, stabilní trimery a částečné tetramery v lipidové membráně POPC při pH 7. Na časovém intervalu 500 ns H1 kolicinu U počínaje formou monomeru prakticky oligomerizoval přes všechny tyto zmíněné stupně. Toto jeho chování bude třeba podrobit podrobnější analýze. Také plánuji provést MD simulace těchto helixů v mnohem větší lipidové membráně, protože jejich koncentrace ve vypočítané MD simulaci byla velmi vysoká.

Dalším zajímavým efektem viditelným z MD simulace bylo, že H1 peptidy způsobily kumulaci téměř všech protiiontů  $\text{Na}^+$  pouze v jedné monovrstvě membrány. Dva (ev. tři) tyto ionty jsou schopny helixy vyvazovat a držet jejich struktury v blízkosti kinku (u C-konce) u sebe. Pór vytvořený těmito oligomerizovanými H1 měl obvykle tvar asymetrických přesýpacích hodin (což mj. odpovídá i publikovanému tvaru póru pro kolicin Ia). Zúžení póru bylo mezi helixem s kinkem a dalšími dvěma helixy bez výrazného kinku. Obvykle v něm byly silně navázány ionty  $\text{Na}^+$ . Jejich vazba by mohla být opět omezena použitím nižšího pH. Tyto ionty by pak mohly snadněji pronikat pórem a příliš neblokovat jeho průchod. MD simulace protonizovaných helixů H1, které plánuji provést, by měly ukázat smysluplnost tohoto předpokladu.

## 6.3 Úloha H2, H3 na stavbě póru

V MD simulaci jsem pozorovala, že H2 a H3 současně procházejí transmembránově a zužují lipidovou membránu, kterou také toroidně zakřívují a působí tvorbu póru. Fyzikální podstatu tohoto jevu ještě nemám zanalyzovanou. Nicméně podle prvních analýz se zdá, že jsou lipidové

hlavičky POPC membrány vmezeřeny mezi tyto dva helixy a jejich řetězce mastných kyselin jsou potom v takto narušené membráně orientovány horizontálně.

## 6.4 Úloha H4, H6 a H5, H7 na stavbě póru

H4 a H6 v MD simulacích vykazovaly zatím nejednoznačné chování. Ohledně jejich přesné lokalizace vůči membráně nejsem zatím přesvědčená a chci provést další MD simulace těchto helixů i pro další příbuzné koliciny. Jejich nejednoznačné chování bylo pravděpodobně způsobeno tím, že sekvence, kterou jsem k jejich studiu zvolila, nevykazovala v lipidové membráně helicitu, protože nebyla kompletní. H4 i H6 v lipidové dvojvrstvě okamžitě ztrácely helicitu. H4 dokonce v MD s vodou tvořil  $\beta$ -vlásku a v jednom případě MD simulace lipidovou membránu samovolně opustil. Až v MD simulaci čtveřice helixů začal i H4 vykazovat helicitu v lipidové membráně. Helicita se poprvé objevila i u H6 - nicméně helikální byla spíše jeho část sekvence, která v solubilním stavu (krystalové struktuře) byla nestrukturovaná a mně v MD simulaci jednoduše chyběla. Provedla jsem tedy MD simulaci helixu H6 o nesprávné sekvenci. Část tohoto helixu H6 se pravděpodobně účastní spolu s H5 a H7 v mechanismu otevírání a uzavírání kolicinového kanálu.

O helixu H5 z MD simulací předpokládám, že prochází transmembránově a že je schopný odpovídat na změny napětí na membráně svou lokalizací. Toto ale opět musím ještě ověřit ve své další práci. H7 obsahoval ve všech MD simulacích velmi nápadné vazebné místo na své struktuře, do kterého se během MD simulace navazují (a opětovně vyvazují) dva ionty  $\text{Na}^+$ . Pravděpodobnost výskytu  $\text{Na}^+$  iontů v těchto místech je velmi vysoká. Helix H7 v MD simulaci také projevil jistou strukturní citlivost k těmto iontům. Tento helix by se proto mohl uplatňovat jako napětěově závislý a participovat v otevírání a zavírání kanálu kolicinu U. Dále v závislosti na tom, v jaké pozici je v membráně, vykazuje jeho helikální struktura kink.

## 6.5 Hydrofobní vlásenka H8-H9

Vlásenka H8-H9 kolicinu U byla v POPC membráně transmembránově orientovaná, což je v souladu s literaturou pro helixy H8-H9 ostatních kolicinů. Kolicin U v uzavřeném stavu póru zaujímá strukturu deštníkového modelu aktualizovaného podle Lugo et al. 2016. Publikace zaměřené na výpočet volné energie pro jednotlivé modely a jednotlivé koliciny ukazovaly, že oba

modely (penknife i umbrella) mohou být z energetického hlediska vhodné. Ty ale nepřepokládají, že H9 je schopný s POPC hlavičkami interagovat způsobem, který jsem pozorovala v MD simulaci. Proto jeho umístění v horizontální orientaci pod POPC hlavičky není rozporuplné. Myslím si však, že kolicin U zaujímá v uzavřeném stavu póru strukturu odpovídající modelu umbrella.

H9 je schopný interagovat s lipidovými hlavičkami za udržení stabilní helikální struktury. Ovšem pouze jednou svou stranou. H8 není schopný být v interakci s POPC hlavičkami, dochází k rozvolnění jeho struktury.

## 6.6 Úloha H10 na stavbě póru kolicinu H10

Zatím nebyla úloha helixu H10 na stavbě póru vůbec uvažována. Nedohledala jsem žádnou vědeckou publikaci zohledňující H10. Nicméně z mých MD výsledků je jeho vliv zřejmý – nebo alespoň pro membránu POPC a kolicin U. Před publikací tohoto tvrzení ve formě článku bude však třeba provést ještě sadu dalších MD simulací pro H10 dalších pórtvorných kolicinů a pro různé lipidové membrány. To, že je tento helix krátký a neprojde napříč membránou, není opět vůbec překážkou. Helix H10 obsahuje na svém konci přirozený C-terminální konec. Celý peptid H10 je obvykle velmi nabitý u všech pórtvorných kolicinů. Myslím si, že po inkorporaci H8-H9 vlásenky do membrány, je do membrány zároveň lokalizován i tento helix. Samovolně pak dochází k interakci jeho přirozeného C-konce s opačnou polární monovrstvou membrány. Elektrostatické interakce, které se zde uplatňují, vyvolají lokální přeuspořádání lipidů opačné monovrstvy, které „doplní část chybějícího helixu“. H10 je tak schopen poměrně silně rozrušit lipidovou membránu. V MD simulaci bylo pozorováno, že tímto pórem prošel  $\text{Na}^+$  minimálně 1x na každou MD simulaci. Nicméně ionty  $\text{Na}^+$  zde byly přidávány pouze jako protiionty k záporně nabitému peptidu H10 a jejich koncentrace v membráně byla nízká. MD simulace celého segmentu obsahující H7-H8-H9-H10 ukázala, že pórtvorné chování H10 pravděpodobně není artefaktem, ale jedná se o přirozený proces, ke kterému v reálné membráně skutečně dochází. Jak už jsem ale zmínila výše, bude to třeba ještě ověřit.

Jeho chování je také podporováno chováním helixu H9. Ten je schopný při vhodném natočení své struktury tolerovat velmi blízkou přítomnost POPC hlaviček a molekul vody. Což je v případě H10, která se projevuje nejpórtvorněji ze všech helixů kolicinu U, nutné. Pravděpodobně by i H9 mohl tvořit stěnu póru.

## 6.7 Dynamika póru a tloušťka lipidové membrány a další možnosti

Pozorování chování segmentů čtveřic helixů (H1-H2-H3-H4, H4-H5-H6-H7, H7-H8-H9-H10) v MD simulaci by také mohlo naznačovat, že H1 možná tvoří v lipidové membráně transientní póry.

MD simulace těchto segmentů dále ukazují, že helixy jsou velmi mobilní a jsou schopny velmi rychle v membráně měnit svou sekundární strukturu. Některé (hlavně H4) potřebují k udržení jejich stabilní helikální konformace v lipidové membráně interakčního partnera ve formě dalšího helixu. Některé potřebují interakčního partnera v podobě dalšího helixu k protržení a toroidnímu zakřivení lipidové dvojvrstvy (H2 a H3).

Zdá se, že i když je většina helixů CTD kolicinu U o krátké AMK sekvenci, tak to nepřekáží ve vytvoření membránového póru v POPC membráně. Tyto helixy jsou tak rafinované, že jsou schopny lipidovou dvojvrstvu lokálně ztenčit. Tudíž ani není teoreticky jejich délka (20 AMK na trans prostup membránou) nutná. V literatuře jsou informace o stanovení membránové topologie jednotlivých helixů CTD kolicinu A a Ia na základě značení biotinem. Nicméně linker (k připevnění biotinu k cysteinu), který byl k takovým měřením použit, byl dlouhý 1,5 nm. Pokud jsou helixy CTD kolicinů skutečně schopny lipidovou membránu lokálně zužovat, tak to pak vyvolává jistou pochybnost. Autoři takovýchto článků určili orientaci cis a trans, nicméně mohli ale také detekovat dané residuum na styku s vodní fází i v situaci, kdy bylo ve skutečnosti ještě transmembránově lokalizované a účastnit se stavby póru. Ve své další práci bych se proto chtěla věnovat např. i MD simulacím s biotinylovaným linkerem.

## 6.8 Další výhled

V rámci svého dalšího studia plánuji provést MD simulace trojic a čtveřic helixů s navázanou fluorescenční značkou - badanem - a sledovat, kde se badan bude nacházet a jak bude ovlivňovat chování samotných peptidů. Dále chci provést MD simulace helixů se změněnými protonačními stavy k odhalení pozadí experimentálních zavislostí aktivit kolicinových kanálů na pH. Také bych ráda prověřila iontová interakční místa na struktuře helixů H1 a H7 a pokusila se zjistit (ev. prokázat) souvislost s iontovou selektivitou kolicinových kanálů. Též bych chtěla studovat vliv vápníku na chování těchto peptidů v MD simulacích.

Ve své další práci bych se také chtěla věnovat simulacím celých C-terminálních domén pórotvorných kolicinů.



## 7 Shrnutí

- Pomocí metody MD simulací, chemické syntézy peptidu H1 a měření na BLM jsem zjistila, že H1 CTD kolicinu U vykazuje pórtvornou aktivitu a pravděpodobně se účastní stavby póru v otevřeném stavu.
- Z MD simulací helixů H1 příbuzných kolicinů, pro které byla publikována krystalografická struktura v solubilním stavu, jsem zjistila, že H1 CTD kolicinů A a Ia je schopný toroidně zakřivit lipidovou membránu, což podporuje model struktury kolicinového kanálu pro E1 navrženým Sobkem et al. (2004).
- Identifikovala jsem jev a nabitá residua H1 pórtvorného kolicinu A a Ia zodpovědná za protržení membrány a ztrátu její funkce. Dále si myslím, že další studium těchto reziduí uplatňujících se v tvorbě póru by mohlo vést k vysvětlení experimentálních závislostí aktivit kolicinových kanálů na různém pH roztoku.
- V MD simulaci jsem pozorovala, že H1 kolicinu U je schopný tvořit stabilní trimery.
- Identifikovala jsem vazebná místa pro ionty  $\text{Na}^+$  na povrchu struktury H1 kolicinu U a všech dalších H1 helixů pórtvorných kolicinů, pro které byla publikována jejich terciární struktura v PDB. Navazující MD simulace s jinými ionty by mohly vést k vysvětlení experimentálně pozorované iontové selektivity kolicinových kanálů.
- Identifikovala jsem další helixy kolicinu U jako pórtvorné – H2, H3, se pravděpodobně účastní stavby póru v otevřeném stavu. H3 má také schopnost toroidně zakřivit membránu.
- Zjistila jsem, že dynamika sekundární struktury helixů CTD je velmi vysoká. Jsou schopny změnit nestrukturovanou oblast pro sekundární strukturu z modelů v solubilním stavu na helikální pro oblast membrány (a naopak) v časovém intervalu např. 100 nanosekund. Tímto přechodem procházejí hlavně helixy H4, a H6.
- Dále jsem zjistila, že H5 a H7 by se mohly účastnit mechanismu otevírání a uzavírání kanálů dle vloženého vnějšího napětí na membránu.
- Z MD simulací dále vyplynulo, že helix H8 a H9 kolicinu U je v lipidové membráně orientován transmembránově. Na základě toho jsem určila, že kanál kolicinu U v uzavřeném stavu lze popsat modelem umbrella (aktualizovaným dle Lugo et al. 2016).
- Také jsem zjistila, že ač je H9 hydrofobní, je teoreticky schopný se podílet na stavbě póru a tvořit jeho stěnu, neboť vykazuje naprosto specifické chování.

- Pozorovala jsem, že doposud nikým neuvažovaný H10 se pravděpodobně účastní na stavbě póru. Jeho efekt, alespoň pro kolicin U, je nejmarkantnější ze všech studovaných helixů. Je to helix o krátké AMK sekvenci, který dokáže lipidovou membránu lokálně „ztenčit“ a způsobit toroidní zakřivení, které vede ke ztrátě funkce membrány.
- Dále jsem pozorovala, že i když jsou některé helixy CTD kolicinu U o velmi krátké AMK sekvenci, jsou schopné poškozovat membránu tím, že ji jsou schopné zakřivit nebo lokálně ztenčit.
- Zjistila jsem, že pro MD simulace kolicinu U je vhodnější vycházet ze strukturního modelu CTD v solubilním stavu (iTasser) než z modelu vygenerovaným RosettaMembrane.
- Sepsala jsem praktický podrobný manuál své práce pro MD simulace peptidů v membránách a dávám ho k dispozici všem jako přílohu této práce.

## 8 Seznam literatury

Albericio, F., Chinchilla, R., Dodsworth, D. J., & Nájera, C. (2001). New trends in peptide coupling reagents. *Organic Preparations and Procedures International*, 33(3), 203-303.

Allen, M. P. (2004). Introduction to molecular dynamics simulation. *Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins*, 23, 1-28.

Amblard, M., Fehrentz, J. A., Martinez, J., & Subra, G. (2006). Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Molecular biotechnology*, 33(3), 239-254.

Andersen, H. C. (1980). Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *The Journal of chemical physics*, 72(4), 2384-2393.

Arnold, T., Zeth, K., & Linke, D. (2009). Structure and function of colicin S4, a colicin with a duplicated receptor-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 284(10), 6403-6413.

Bakan, A., Meireles, L. M., & Bahar, I. (2011). ProDy: protein dynamics inferred from theory and experiments. *Bioinformatics*, 27(11), 1575-1577.

Baty, D., Knibiehler, M., Verheij, H., Pattus, F., Shire, D., Bernadac, A., & Lazdunski, C. (1987). Site-directed mutagenesis of the COOH-terminal region of colicin A: effect on secretion and voltage-dependent channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(5), 1152-1156.

Baty, D., Lakey, J., Pattus, F., & Lazdunsky, C. (1990). A 136-amino-acid-residue COOH-terminal fragment of colicin A is endowed with ionophoric activity. *The FEBS Journal*, 189(2), 409-413.

Berendsen, H. J., Postma, J. V., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. R. H. J., & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of chemical physics*, 81(8), 3684-3690.

Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., ... & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, 42(W1), W252-W258.

Bullock, J. O., & Kolen, E. R. (1995). Ion selectivity of colicin E1: III. Anion permeability. *Journal of Membrane Biology*, 144(2), 131-145., citováno podle Parker a Feil 2005.

Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of chemical physics*, 126(1), 014101.

Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubes, R., Postle, K., ... & Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(1), 158-229.

Collarini, M., Amblard, G., Lazdunski, C., & Pattus, F. (1987). Gating processes of channels induced by colicin A, its C-terminal fragment and colicin E 1 in planar lipid bilayers. *European Biophysics Journal*, 14(3), 147-153.

Cramer, W. A., Zhang, Y. L., Schendel, S., Merrill, A. R., Song, H. Y., Stauffacher, C. V., & Cohen, F. S. (1992). Dynamic properties of the colicin E1 ion channel. *FEMS Microbiology Letters*, 105(1-3), 71-81.

DeLano, W. L. (2002). The PyMOL user's manual. DeLano Scientific, San Carlos, CA, 452.

Dolejšová, T. Topologie a funkce transmembránové domény kolicinu U, bakterie *Shigella boydii*.

Duché, D., Parker, M. W., González-Manas, J. M., Pattus, F., & Baty, D. (1994). Uncoupled steps of the colicin A pore formation demonstrated by disulfide bond engineering. *Journal of Biological Chemistry*, 269(9), 6332-6339.

Dunkel, S., Pulagam, L. P., Steinhoff, H. J., & Klare, J. P. (2015). In vivo EPR on spin labeled colicin A reveals an oligomeric assembly of the pore-forming domain in *E. coli* membranes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(7), 4875-4878.

Elkins, P., Bunker, A., Cramer, W. A., & Stauffacher, C. V. (1997). A mechanism for toxin insertion into membranes is suggested by the crystal structure of the channel-forming domain of colicin E1. *Structure*, 5(3), 443-458.

Essman, U., Perera, L., Berkowitz, M., Darden, T., Lee, H., and Pedersen, L.G. (1995) A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* 103, 8577–8593.

Evans, L. J., Goble, M. L., Hales, K. A., & Lakey, J. H. (1996). Different sensitivities to acid denaturation within a family of proteins: implications for acid unfolding and membrane translocation. *Biochemistry*, 35(40), 13180-13185.

Ewald, P. P. *Ann. d. Physik* 64 (1921), 253.

Freitag, S., Le Trong, I., Chilkoti, A., Klumb, L. A., Stayton, P. S., & Stenkamp, R. E. (1998). Structural studies of binding site tryptophan mutants in the high-affinity streptavidin-biotin complex. *Journal of molecular biology*, 279(1), 211-221.

Fields, G. B., & NOBLE, R. L. (1990). Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Chemical Biology & Drug Design*, 35(3), 161-214.

Ghahremanpour, M. M., Arab, S. S., Aghazadeh, S. B., Zhang, J., & van der Spoel, D. (2013). MemBuilder: a web-based graphical interface to build heterogeneously mixed membrane bilayers for the GROMACS biomolecular simulation program. *Bioinformatics*, 30(3), 439-441.

Greig, S. L., Radjainia, M., & Mitra, A. K. (2009). Oligomeric structure of colicin ia channel in lipid bilayer membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(24), 16126-16134.

Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C., and Fraaije, J.G.E.M. (1998) LINCS: A linear constraint solver for molecular simulation. *J. Comput. Chem.* 18, 1463–1472

Hess, B., Kutzner, C., Van Der Spoel, D., & Lindahl, E. (2008). GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of chemical theory and computation*, 4(3), 435-447.

Hilsenbeck, J. L., Park, H., Chen, G., Youn, B., Postle, K., & Kang, C. (2004). Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 Å resolution. *Molecular microbiology*, 51(3), 711-720.

Ho, D., Lugo, M. R., Lomize, A. L., Pogozheva, I. D., Singh, S. P., Schwan, A. L., & Merrill, A. R. (2011). Membrane topology of the colicin E1 channel using genetically encoded fluorescence. *Biochemistry*, 50(22), 4830-4842.

Ho, D., Lugo, M. R., & Merrill, A. R. (2013). Harmonic analysis of the fluorescence response of bimane adducts of colicin E1 at helices 6, 7, and 10. *Journal of Biological Chemistry*, 288(7), 5136-5148.

Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 33-38.

Chan, W. C., & White, P. D. (2000). *Fmoc solid phase peptide synthesis*. Oxford University Press.

Jakes, K. S., & Cramer, W. A. (2012). Border crossings: colicins and transporters. *Annual review of genetics*, 46, 209-231.

Jakes, K. S., Kienker, P. K., & Finkelstein, A. (1999). Channel-forming colicins: translocation (and other deviant behaviour) associated with colicin Ia channel gating. *Quarterly reviews of biophysics*, 32(2), 189-205.

Kabsch, W. and Sanders, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers* 22, 2577–2637.

Karasawa, N.; Goddard, W. A., III: Acceleration of convergence for lattice sums. *J. Phys. Chem.* 93 (1989), 7320–7327.

Kienker, P. K., Jakes, K. S., & Finkelstein, A. (2000). Protein Translocation across Planar Bilayers by the Colicin Ia Channel-Forming Domain. *The Journal of general physiology*, 116(4), 587-598.

Kienker, P. K., Qiu, X. Q., Slatin, S. L., Finkelstein, A., & Jakes, K. S. (1997). Transmembrane insertion of the colicin Ia hydrophobic hairpin. *The Journal of membrane biology*, 157(1), 27-37.

Kim, Y., Valentine, K., Opella, S. J., Schendel, S. L., & Cramer, W. A. (1998). Solid-state NMR studies of the membrane-bound closed state of the colicin E1 channel domain in lipid bilayers. *Protein science*, 7(2), 342-348.

Krasilnikov, O. V., Da Cruz, J. B., Yuldasheva, L. N., Varanda, W. A., & Nogueira, R. A. (1998). A novel approach to study the geometry of the water lumen of ion channels: colicin Ia channels in planar lipid bilayers. *Journal of Membrane Biology*, *161*(1), 83-92.

Lakey, J. H., Parker, M. W., Gonzales-Mañas, J. M., Duché, D., Vriend, G., Baty, D., & Pattus, F. (1994). The role of electrostatic charge in the membrane insertion of colicin A. *The FEBS Journal*, *220*(1), 155-163.

Lakey, J. H., Baty, D., & Pattus, F. (1991). Fluorescence energy transfer distance measurements using site-directed single cysteine mutants: the membrane insertion of colicin A. *Journal of molecular biology*, *218*(3), 639-653.

Lakey, J.H., Duche, D., Gonzáles-Mañas, J.-M., Baty, D., and Pattus, F. (1993). Fluorescence Energy Transfer Distance Measurements: The Hydrophobic Helical Hairpin of Colicin A in the Membrane Bound State. *J. Mol. Biol.* *230*, 1055–1067.

Lakey, J. H., & Slatin, S. L. (2001). Pore-forming colicins and their relatives. In *Pore-forming toxins* (pp. 131-161). Springer Berlin Heidelberg.

Lennard-Jones, J. E. (1924), "On the Determination of Molecular Fields", *Proc. R. Soc. Lond. A*, *106* (738): 463–477,

Lindeberg, M., Zakharov, S. D., & Cramer, W. A. (2000). Unfolding pathway of the colicin E1 channel protein on a membrane surface. *Journal of molecular biology*, *295*(3), 679-692.

Liu, Q. R., Crozel, V., Levinthal, F., Slatin, S., Finkelstein, A., & Levinthal, C. (1986). A very short peptide makes a voltage-dependent ion channel: The critical length of the channel domain of colicin E1. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *1*(3), 218-229.

Lugo, M. R., Ho, D., & Merrill, A. R. (2016). Resolving the 3D spatial orientation of helix I in the closed state of the colicin E1 channel domain by FRET. Insights into the integration mechanism. *Archives of biochemistry and biophysics*, *608*, 52-73.

MacKerell, A.D. Jr, et al. (1998) All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics Studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* *102*, 3586–3616.

Malenbaum, S. E., Merrill, A. R., & London, E. (1998). Membrane-inserted colicin E1 channel domain: a topological survey by fluorescence quenching suggests that model membrane thickness affects membrane penetration. *Journal of natural toxins*, *7*(3), 269-290.

Martínez, M. C., Lazdunski, C., & Pattus, F. (1983). Isolation, molecular and functional properties of the C-terminal domain of colicin A. *The EMBO journal*, *2*(9), 1501.

Martyna, G. J., Klein, M. L., & Tuckerman, M. (1992). Nosé–Hoover chains: the canonical ensemble via continuous dynamics. *The Journal of chemical physics*, *97*(4), 2635-2643.

May, R. A., & Stevenson, K. J. (2009). Software review of Origin 8.

- Merrifield, R. B. (1986). Solid phase synthesis. *Science*, 232, 341-348.
- Merrill, A. R., Palmer, L. R., & Szabo, A. G. (1993). Acrylamide quenching of the intrinsic fluorescence of tryptophan residues genetically engineered into the soluble colicin E1 channel peptide. Structural characterization of the insertion-competent state. *Biochemistry*, 32(27), 6974-6981.
- Morein, S., Andersson, A. S., Rilfors, L., & Lindblom, G. (1996). Wild-type Escherichia coli cells regulate the membrane lipid composition in a window between gel and non-lamellar structures. *Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 6801-6809.
- Morse, P. M. Diatomic molecules according to the wave mechanics. II. vibrational levels. *Phys. Rev.* 34:57–64, 1929
- Nardi, A., Slatin, S. L., Baty, D., & Duché, D. (2001). The C-terminal half of the colicin A pore-forming domain is active in vivo and in vitro. *Journal of molecular biology*, 307(5), 1293-1303.
- Nosé, S. (1984). A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular physics*, 52(2), 255-268.
- Nosé, S. (1984). A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *J. Chem. Phys.*, 81,511–519.
- Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A.E., and van Gunsteren, W.F. (2004) A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* 25, 1656–1676.
- Palmer, L. R., & Merrill, A. R. (1994). Mapping the membrane topology of the closed state of the colicin E1 channel. *Journal of Biological Chemistry*, 269(6), 4187-4193.
- Parker, M. W., & Feil, S. C. (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in biophysics and molecular biology*, 88(1), 91-142.
- Parker, M. W., Postma, J. P., Pattus, F., Tucker, A. D., & Tsernoglou, D. (1992). Refined structure of the pore-forming domain of colicin A at 2.4 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 224(3), 639-657.
- Pattus, F., Massotte, D., Wilmsen, H. U., Lakey, J., Tsernoglou, D., Tucker, A., & Parker, M. W. (1990). Colicins: prokaryotic killer-pores. *Experientia. Basel*, 46(2), 180-192
- Peterson, A. A., & Cramer, W. A. (1987). Voltage-dependent, monomeric channel activity of colicin E1 in artificial membrane vesicles. *The Journal of membrane biology*, 99(3), 197-204.
- Ponder, J. W., & Case, D. A. (2003). Force fields for protein simulations. *Advances in protein chemistry*, 66, 27-85.

Prieto, L., & Lazaridis, T. (2011). Computational studies of colicin insertion into membranes: The closed state. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(1), 126-141.

Qiu, X. Q., Jakes, K. S., Kienker, P. K., Finkelstein, A., & Slatin, S. L. (1996). Major transmembrane movement associated with colicin Ia channel gating. *The Journal of general physiology*, 107(3), 313-328.

Rahman, A. (1964). Correlations in the motion of atoms in liquid argon. *Physical Review*, 136(2A), A405.

Rohl, C. A., Strauss, C. E., Misura, K. M., & Baker, D. (2004). Protein structure prediction using Rosetta. *Methods in enzymology*, 383, 66-93.

Ryckaert, J.P, Ciccotti, G., and Berendsen, H.J.C. (1977) Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints; molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comp. Phys.* 23, 327–341.

Shin, Y. K., Levinthal, C., Levinthal, F., & Hubbell, W. L. (1993). Colicin E1 binding to membranes: time-resolved studies of spin-labeled mutants. *Science*, 259(5097), 960-964.

Schein, S. J., Kagan, B. L., & Finkelstein, A. (1978). Colicin K acts by forming voltage-dependent channels in phospholipid bilayer membranes. *Nature*, 276(5684), 159-163.

Schendel, S. L., & Cramer, W. A. (1994). On the nature of the unfolded intermediate in the in vitro transition of the colicin E1 channel domain from the aqueous to the membrane phase. *Protein Science*, 3(12), 2272-2279.

Slatin, S. L., Duche, D., Kienker, P. K., & Baty, D. (2004). Gating movements of colicin A and colicin Ia are different. *The Journal of membrane biology*, 202(2), 73-83.

Slatin, S. L., Nardi, A., Jakes, K. S., Baty, D., & Duché, D. (2002). Translocation of a functional protein by a voltage-dependent ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), 1286-1291.

Slatin, S. L., Qiu, X. Q., Jakes, K. S., & Finkelstein, A. (1994). Identification of a translocated protein segment in a voltage-dependent channel. *Nature*, 371(6493), 158-161.

Smajs, D., Pilsl, H., & Braun, V. (1997). Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *Journal of bacteriology*, 179(15), 4919-4928.

Sobko, A. A., Kotova, E. A., Antonenko, Y. N., Zakharov, S. D., & Cramer, W. A. (2006). Lipid dependence of the channel properties of a colicin E1-lipid toroidal pore. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 14408-14416.

Sobko, A. A., Kotova, E. A., Zakharov, S. D., Cramer, W. A., & Antonenko, Y. N. (2006). Lipid-mediated inactivation of colicin E1 channels by calcium ions. *Biochemistry (moscow)*, 71(1), 99-103.



Song, H. Y., & Cramer, W. A. (1991). Membrane topography of ColE1 gene products: the immunity protein. *Journal of bacteriology*, 173(9), 2935-2943.

STEER, B. A., DINARDO, A. A., & MERRILL, A. R. (1999). Colicin E1 forms a dimer after urea-induced unfolding. *Biochemical Journal*, 340(3), 631-638.

Steer, B. A., & Merrill, A. R. (1994). The colicin E1 insertion-competent state: detection of structural changes using fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry*, 33(5), 1108-1115.

Stone, A. (2013). The theory of intermolecular forces. OUP Oxford.

Tien, H. T., & Dawidowicz, E. A. (1966). Black lipid films in aqueous media: A new type of interfacial phenomenon: Experimental techniques and thickness measurements. *Journal of colloid and interface science*, 22(5), 438-453.

Tory, M. C., & Merrill, A. R. (1999). Adventures in Membrane Protein Topology A STUDY OF THE MEMBRANE-BOUND STATE OF COLICIN E1. *Journal of Biological Chemistry*, 274(35), 24539-24549.

Tuckerman, M. B. B. J. M., Berne, B. J., & Martyna, G. J. (1992). Reversible multiple time scale molecular dynamics. *The Journal of chemical physics*, 97(3), 1990-2001.

Van der Goot, F. G., & Gonzalez-Manas, J. M. (1991). A'molten-globule'membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature*, 354(6352), 408.

Verlet., L. Computer experiments on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* 159:98–103, 1967.

Vetter, I. R., Parker, M. W., Pattus, F., & Tsernoglou, D. (1996). Insights into membrane insertion based on studies of colicins. In *Protein Toxin Structure* (pp. 5-23). Springer Berlin Heidelberg.

Vetter, I. R., Parker, M. W., Tucker, A. D., Lakey, J. H., Pattus, F., & Tsernoglou, D. (1998). Crystal structure of a colicin N fragment suggests a model for toxicity. *Structure*, 6(7), 863-874.

Wiener, M., Freymann, D., Ghosh, P., & Stroud, R. M. (1997). Crystal structure of colicin Ia. *Nature*, 385(6615), 461.

Wu, S., Skolnick, J., & Zhang, Y. (2007). Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. *BMC biology*, 5(1), 17.

Xu, D., & Zhang, Y. (2012). Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 80(7), 1715-1735.

Zakharov, S. D., & Cramer, W. A. (2002). Colicin crystal structures: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1565(2), 333-346.

Zakharov, S. D., Lindeberg, M., & Cramer, W. A. (1999). Kinetic description of structural changes linked to membrane import of the colicin E1 channel protein. *Biochemistry*, 38(35), 11325-11332.

Zakharov, S. D., Lindeberg, M., Griko, Y., Salamon, Z., Tollin, G., Prendergast, F. G., & Cramer, W. A. (1998). Membrane-bound state of the colicin E1 channel domain as an extended two-dimensional helical array. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4282-4287.

Zakharov, S. D., Rokitskaya, T. I., Shapovalov, V. L., Antonenko, Y. N., & Cramer, W. A. (2002). Tuning the membrane surface potential for efficient toxin import. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), 8654-8659.