

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Matej Kožić

Student 1. godine doktorskog sveučilišnog studija KEMIJA

**Modeliranje elektroporacije membrana simulacijama molekulske dinamike**

Izrađeno za kemijski seminar I prema radu:

**Simulation of pore formation in Lipid Bilayer by Mechanical Stress and Electric Fields**

D. P. Tielman, H. Leontiadou, A. E. Marko, S. J. Marrink, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 6328-6383.

Zagreb, godina 2025.

1. UVOD

Unos eksternih tvari u (bakterijsku) stanicu svakodnevna je potreba istraživača mnogih područja životnih znanosti (engl. *life sciences*). Od biologije, molekularne biologije, biokemije, kemije, do medicine jedna od čestih potreba je unijeti vanjsku DAN u bakterijsku stanicu. U tu svrhu razvijeno je mnogo metoda, među kojima se ističe elektroporacija zbog svoje efikasnosti u transformaciji stanca (unosu vanjskog genetskog materijala, poput DNA, u stanicu).[1-6] Podlaganju stanica električnom polju određene jakosti u membrani stanice stvaraju se „rupe“ kroz koje vanjska tvar poput DNA može ući u stanicu. No, usprkos raširenosti uporabe koja seže u prošlo stoljeće, svi detalji mehanizma elektroporacije na atomističkoj skali nisu sasvim poznati.[1-6]

*In silico* pristupi omogućavaju proučavanje sustava u atomističkoj rezoluciji što može otkriti detalje mehanizama i procesa koji su nevidljivi ostalim metodama. Razlog toga je što ostale (eksperimentalne) metode istražuju cijeli ansambl sustava, zbog čega makroskopska svojstva koja bivaju mjerena budu samo makroskopski prosjeci ansambla od puno mikroskopskih sustava. *In silico* metode poput simulacija molekulske dinamike omogućavaju proučavanje pojedinačnih mikroskopskih sustava koji izgrađuju makroskopski ansambl. Iz tog razloga, s *in silico* pristupima moguće je doći do zaključaka o ponašanju individualnih sustava. Među raznim postojećim *in silico* pristupima ističe se molekulska dinamika kao simulacijska (simulacije molekulske dinamike, SMD) metoda prikladna ovoj uporabi.[7]

* 1. Simulacije molekulske dinamike

Simulacije molekulske dinamike opisuju atomistički sustav kao sklop kuglica i opruga. Svaka kuglica predstavlja atom, i posjeduje svojstva mase, naboja i dr. koja najbolje opisuju atom koji predstavlja. Slično tome, opruge predstavljaju kemijske veze, te svojstvima poput konstante opruge i dr. opisuju te veze. Kovalentne veze se uzimaju kao opruge koje ne mogu pucati, dok se druge nekovalentne interakcije modeliraju potencijalima koji imaju određeni domet nakon kojeg se prestaju računati. Na taj način su sve elektronske interakcije uzete u obzir računa, ali implicitno. Te elektronske interakcije implicitno su opisane u svojstvima tih kuglica i parametrima tih potencijala. A oni sežu od jednostavnih harmoničkih, do kompliciranijih poput Lennard-Jones potencijala. Parametri svojstava kuglica i opruga zapisani su u tzv. Polju sila. Ono je jedno samo-usklađeno „polje“ kojim će se računati vrijednosti svih sila i interakcija. Polje sila određuje se da empirijski odgovara eksperimentalnim vrijednostima. Za različite svrhe postoje različita polja sila, pa tako neka su pogodna za SMD proteina, druga za lipida i DNA, a neka za male organske molekule. Iz tog razloga je odabir pogodnog polja sila imperativan za dobro izvođenje SMD. U sadašnjem vremenu za simulacije lipida i nukleinskih kiselina CHARMM36 i CHARMM36m polja sila[8,9] pokazala su se najboljima.[7]

Za SMD potrebno je izgraditi sustav molekula koji odgovara realnom uvjetu, npr. Lipidni dvosloj sa molekulama vode oko njega. Zatim se svakom atomu dodjeli početna brzina tako da cijeli sustav ukupno odgovara zadanoj temperaturi (brzina se dodjeli nasumično prema Boltzmannovoj raspodjeli brzina pri danoj temperaturi), i onda se za definirani vremenski korak *dt* računaju Newtonove jednadžbe gibanja. One u suštini odgovaraju na pitanje „gdje bi završila svaka čestica u vremenu *t* + *dt* ako ima početnu brzinu v i na nju djeluje ukupna sila *F*“. U tome je *dt* definirani vremenski korak, *v* je vektor njene brzine u vremenu *t*, a *F* je ukupna sila koja je suma svih sila od veznih i ne veznih interakcija sa svim ostalim česticama. Te račune izvode visokospecijalizirani programi, među kojima se može istaknuti GROMACS[10] kao jedan od najboljih i najkorištenijih.

Pored računanja svih čestica eksplicitno, moguće je provesti tzv. *Coarse Grained* (CG) simulaciju. U njoj se više atoma simulira jednom kuglicom, pa tako npr. lipidni rep od 20 atoma ugljika i sa svojim pripadnim vodicima bude opisan samo s 10 kuglica gdje svaka predstavlja dva atoma ugljika i pripadne vodike. U tim CG simulacijama koriste se svrsi skrojena CG polja sila koja su utočnjena upravo na tu aproksimaciju, kako bi davala što bolji i što vjerniji rezultat. A glavna prednost takvog pristupa je što omogućava daleko veće sustave i kraća vremena simulacije, i to iz dva razloga: 1) Simulira se manje atoma, i 2) koristi se veći vremenski korak *dt*. Stoga, CG pristupi vrlo su atraktivno rješenje za potrebe simuliranja ogromnih sustava gdje atomistička rezolucija nije moguća zbog tehničkih ili vremenskih ograničenja. Mana im je što onda implicitno uzimaju sve izravno-atomističke interakcije i fenomene, pa je sama „rezolucija“ simulacije manja. Ali za jako velike sustave takvi efekti su sve više i više zanemarivi. Jedan od primjera CG polja sila je Martini polje sila.[11]

Cilj računalnih simulacije, konceptualno, je emulirati ponašanje sustava iz stvarnog svijeta u računalu. Sustav se izgradi da što bliže (unutar korištenih aproksimacija) replicira sustav iz stvarnog svijeta. Sustav (podvrgnut uvjetima koji mu se zadaju) se analizira, te se rezultati uspoređuju s rezultatima iz eksperimentalnog „pravog svijeta“. Ako simulacija prođe tu validaciju i utemelji se da je ona dobar model stvarnosti i da dobro modelira procese koji se istražuju, zaključci koji se dalje vuku iz analize simulacije (kada se npr. podvrgne različitim uvjetima) mogu se smatrati aplikabilnim i vjerodostojnim. Stoga, vidi se da nije potrebno samo izgraditi sustav, već se uvjeriti da je on dobro izgrađen kroz validaciju usporedbom sa sustavima iz pravog svijeta. U sferi simulacija molekulske dinamike validacija (sustava) se nužno vrši usporedbom s eksperimentalnim mjerenjima.

1. PRIKAZ ODABRANE TEME

S ciljem boljeg razumjevanja mehaničkih svojstava bioloških membrana, autori su simulacijama molekulske dinamike simulirali dvosloj dipalmitoilfosfatidilkolina (DPPC) i dioleilfosfatidilkolina (DOPC). Formacija pora u membrani, korak značajan za mnogi broj drugi eksperimentalnih / bioloških procesa, eksperimentalno je moguće provesti mehanički ili elektroporacijom. No, sami mehanizam istog nije u potpunosti razumjet. Stoga, ta dva pristupa su simulirana *in silico*. Program korišten za SMD bio je GROMACS.[1]

* 1. Mehanički stres

Na dvosloj DPPC-a od ukupno 128 lipida i 6029 eksplicitnih molekula vode, pri temperaturi od 323 K, mehanički stres je emuliran anizotropno primjenjenim tlakom. U z osi tlak je održavan konstantnim pri 1 bar, dok je u x-y ravnini sistematski variran od -50 do -1000 bar. Tako su rađene serije simulacija u trajanjima do 50 ns. Tlak u x-y ravnini odgovara „razvlačenju“ membrane, a naizgled ekstremno visoke vrijednosti matematički su artefakt načina na koji se tlak računa u MD sustavima. U stvarnosti te vrijednosti preračunate u mN/m su reda veličine koji je očekivan za takve eksperimentalne sustave.[1]

Na slici 1 prikazana je tijek događaja stvaranja pore u membrani podlegnutoj mehaničkom stresu. Uvrježeni metrik u analizi SMD membrana je prosječna površina koju zauzima svaki lipid. U ekvilibriranoj strukturi ona je iznosila 0,6 nm2, a nakon što je membrana podvrgnuta tlaku ona se brzo povećala. To je u potpunosti sukladno očekivanju. Formacija pore započinje u 4 do 12 ns u tri replike simulacije. Nakon inicijalnog pucanja i stvaranja početka pore, rupa se brzo širi i poprima cilindričan oblik i fosfolipidi se reorijentiraju polarnim glavama kako bi obložili poru hidrofilnim djelovima fosfolipida. Tako formirana, pora raste dok se do kraja ne destabilizira membrana.[1]

A collage of images of a cell

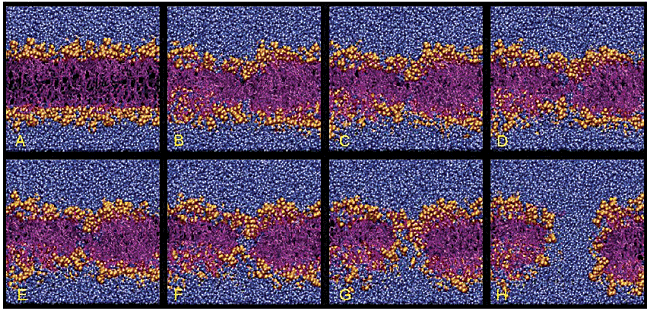
AI-generated content may be incorrect.

Slika 1. Redoslijed događaja formacije pore uslijed mehaničkog stresa u DPPC dvosloju s tlakom u x-y ravnini od -200 bar (odgovara vrijednosti od 90 mN/m). A) Početna struktura, B) pri 11,5 ns dolazi do stanjivanja dvosloja, C) 12,5 ns gdje dolazi do pucanja dvosloja, i D) 12,6 ns dolazi do širenja pore. Plavo predstavlja vode, ljubičasto lance lipida, a narančasto polarne glave. Slika izrađena u programu VMD[12] od strane izvornih autora.[1]

* 1. Električno polje

Sustav sa dvoslojem DOPC lipida izgrađen od 256 lipida i 11 228 voda je korišten za istraživanje utjecaja električnog polja. U simulacijama pri 300 K trajanja od 10 do 20 ns aplicirano je električno polje voltaža 0,33, 0,4, i 0,5 V/nm.[1]

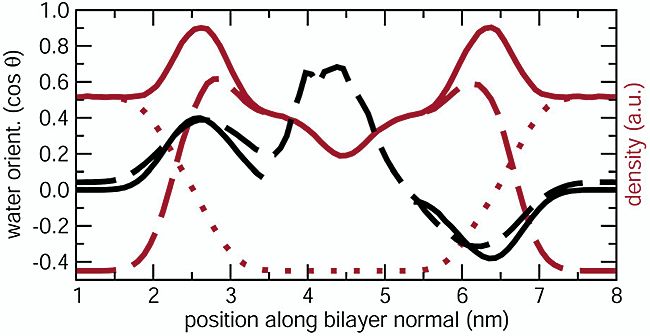
Slika dva predstavlja proces formacija pore u membrani podvrgnutoj električnom polju. Pod utjecajem električnog polja dolazi do povećanog broja defekata gdje voda prodire dublje u hidrofobnu jezgru lipidnih repova membrane. Prodiranje se događa s obje strane dvosloja. Rezultirajući defekti koji su posljedica prodiranja vode u membranu jasno su vidljivi na slici 2.B. Kada se defekti vode „spoje“ s obje strane stvara se tzv. Predpora (engl. *Pre-pore*) koja se brzo širi i dolazi do nastanka prave pore u membrani. Kao i u slučaju formacije pore uslijed mehaničkog stresa, hidrofilne glave se rotiraju da oblože poru i zaštite hidrofilni dio jezgre membrane od vode.[1]



**Slika 2.** Formacija pore u DOPC dvosloju nakon podvrgavanja električnom polju od 0,5 V nm-1. A) Membrana u ~2,40 ns, bez značajnih defekata. B)Membrana u ~3,04 ns, s vodom koja započinje probijanje u membranu s obje strane. Vidljiva je očita deformacija u membrani. C), D), E) Membrana u vremenima od ~3,08 do ~3,15 ns, kada se defekti s obje strane sloja kreću spajati i formirati neprekinuti spoj molekula voda koji probija kroz membranu. F) Membrana u vremenu ~3,25 ns, s neprekinutom strukturom molekula voda koje prolaze kroz nju. G) Vrijeme simulacije ~3,35 ns gdje stupac molekula voda raste i širi se, te započinje reorijentacija narančastih polarnih glavi da obloži početke pore. H) Vrijeme ~3,55 gdje se pora proširila u konačnu veličinu, te su se fosfolipidi reorijentirali kako bi polarnim glavama obložili poru.[1]

U slučaju formacije pore pod mehaničkim stresom, isto kao i pod električnim poljem, prvi korak je stvaranje jednog neprekinutog lanca vode koji prolazi kroz membranu. Zatim slijedi rast tog defekta i reorijentacija hidrofilnih glava što uzrokuje vrlo brzo širenje pore.[1]

Sami mehanizam kojim električno polje uzrokuje formaciju pore nije sasvim razjašnjen ovim radom. Polje interagira s nabijenim polarnim glavama, ali te interakcije nisu presudne za formaciju pre. Na to ukazuju istraživanja koja su opazila nastanak pore usred djelovanja električnog polja u 3 nm bloku oktana (koji nema naboj).[1] Električno polje uzrokuje reorijentaciju molekula vode (slika 3), ali taj efekt u području oko nabijenih polarnih glava nije značajno izražen. Pod utjecajem električnog polja dolazi do značajno više prodiranja molekula vode u membranu u odnosu na kada nema polje. Jednom kada je voda ušla u membranu, izražen je efekt reorijentacije zbog električnog polja. Električno polje također ima utjecaja na orjentacije polarnih glava. Pri električnom polju od 0,4 V / nm, prije formacije pore prosječan kut između vektora P-N veze i normale dvosloja promjeni se od 12 do 8 stupnjeva na jednoj strani, i do 15 na drugoj strani dvosloja.[1]



Slika 3. Grafički prikaz orijentacija molekula vode u odnosu na fosfolipidni dvosloj u simulaciji sa električnim polje od 0,4 V/nm (iscrtkana crna linija) i bez električnog polja (crna puna linija). Bez električnog polja voda ne ulazi u membranu, stoga postoji rupa u punoj crnoj liniji. Dodatno, crvenom bojom prikazana je distribucija molekula u odnosu na z os. Crvena istočkana linija predstavlja distribuciju molekula vode, crvena iscrtkana lipide, a crvena puna sve molekule. Centar dvosloja nalazi se na 4,5 nm.[1]

Pri 0,5 V napona razlika potencijala je usporediva onoj korištenoj u eksperimentima.[1] Autori navode da se iz preliminarnih rezultata naslućuje da bi do formacije pore moglo doći i pri nižim vrijednostima potencijala. Hipoteza koja može objasniti nastanak pora je da električno polje stabilizira defekte molekula voda koje prodiru u membranu. To je uzrokovano činjenicom da molekule voda u malim klasterima, i/ili izolirane molekule vode povoljnije interagiraju s električim polje nisko-dielektričnim uvjetima membrane u odnosu na čisti vodeni medij.[1]

Zaključno, autori navode da se ponašanje lipida i vode razlikuje obzirom na biva li formacija pore inducirana mehaničkim stresom ili električnim poljem. U prisutnosti električnog polja voda postaje visoko orijentirana, i pore se stvaraju bez značajne promjene u površini lipida. Za razliku od toga, mehanički stres uzrokuje stanjivanje dvosloja. U oba slučaja stvaranje pore započinje sa jednim spajanjem molekula voda koje prodiru s obje strane u hidrofobnu jezgru membrane. Kada se spoji neprekinuta linija molekula vode koja prodire kroz debljinu membrane još molekula vode ulazi i stupac vode se brzo širi i deblja. Proces biva stabiliziran reorijentacijom fosfolipida koji polarnim glavama oblažu novonastalu pore. Autori navode kako egzaktan mehanizam i dalje nije sasvim razjašnjen te je potrebno više istraživanja.[1]

1. retrospektiva ovog rada

Rad obrađen u sklopu ovog seminara izrađen je godine 2003. Za to vrijeme on je predstavljao

iskorak u polju jer je proveo nešto novo što do tada nije bilo provedeno, i među prvima (ako ne i prvi) je koji simulira elektroporaciju. Danas, 22 godine nakon, trivijalno je (*in silico*) izgraditi membranske sustave i provesti simiulacije molekulske dinamike istih. No u to vrijeme nije bilo. Iz ovog rada proizašlo je mnogo drugih radova[3-5], kao na primjer rad koji istražuje elektroporaciju s pulsirajućim električnim polje[4], pa rad koji istražuje elektroporaciju membrana arheja[3] i dr.

Svi ti radovi su gradili na radu P. D. Tielman-a i H. Leontiadou-a. Na taj se način, kroz reference, može skoro pa pratiti obiteljsko stablo radova koji se granaju jedni iz drugih i referenciraju jedni druge, a potječu na neki način od ovog rada. Već sama činjenica da su autori pokazali kako se električno polje može vjerno simulirati, otvorilo je vrata simulacijama koje su otkrile nove uvide i nova razumjevanja u mehanizme na atomarnoj rezoluciji. I to ne samo membrana i elektroporacije, nego i šire. Danas je korištenje električnog polja u programu poput GROMACS (koji je jedan od najraširenijih programa za SMD) vrlo jednostavno i definira se kroz tek par linija u kodu. A GROMACS omogučava fino ugađanje polja, kroz oblik krivulje kako izgleda kroz vrijeme, kao snaga trajanje i period pulsa električnog polja, i drugo.

Izvorni rad koristi vrlo jednostavni fosfolipidni dvosloj od DOPC sa ukupno samo 128 lipida i ~6000 molekula vode, i u trajanjima od ~50 ns. Danas su dostupni parametri za membrane od 14 različitih lipida koji sastavom i omjerima vjerno modeliraju membranu određenog soja E. Coli.[6] Trajanja simulacija danas su stotine nanosekundi, a nerijetko i mikrosekunda. Sustavi su također znatno veći i broje stotine tisuća atoma, nerijetko i u milione. Stoga, danas je vrlo vrlo dobro vrijeme za biti u polju molekulske dinamike i membrana. Dostupna su polja sila bolja nego ikad, CG modele koji otvaraju vrata simulacijama skala većih nego ikada[6], membrane atomističnih rezolucija koje točnije nego ikada modeliraju žive organizme poput E. Coli, i dr. što kombinirano s nezamislivim performansama modernih mašina daje naslutiti kako dolazi zlatno doba polja. A na primjeru ovog rada vidi se kako temelji za jednu tako naizgled „jednostavnu“ stvar kao simuliranje elektroporacije sežu preko dva desetljeća unazad. Vidi se kako je svaki rad mali pomak koji gradi na postojećem opusu znanja gdje je svaka cigla mali iskorak koji je otvorio vrata sljedećem malom iskoraku.

1. Literaturni izvori
2. P. D. Tieleman, H. Leontiadou, A. E. Mark, J. S. Marink, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 6382-6383.
3. W. J. Dower, J. F. Miller, C. W. Ragsdale, *Nucleic Acids Res*. ***16*** (1988) 6127–6145.
4. A. Polak, M. Tarek, M. Tomšič, J. Valant, N. P. Ulrih, A. Jamnik, P. Kramar, D. Miklavčič, *Bioelectrochemistry* **100** (2014) 18-26.
5. D. P. Tieleman, *BMC Biochemistry* **5** (2004) 12.
6. L. Delmotte, M. Tarek, *J Membrane Biol* **245** (2012) 531-543.
7. K. Pluhackova, A. Horner, *BMC Biology* (2021) **19:4***.*
8. M. Kožić, Nova metoda analize simulacija molekulske dinamike toplinskim mapama, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2024.
9. B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *J. Comput. Chem*. **4** (1983) 187–217.
10. A. D. MacKerell Jr., D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack Jr., *et al.*, *J. Phys Chem**B.***102** (1998) 3586–3616.
11. D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, *J. Comput. Chem.***26** (2005) 1701–1718.
12. S. J. Marrink, H. J. Risselada, S. Yefimov, D. P. Tieleman, A. H. de Vries, *J. Phys Chem**B.***111** (2007) 7812–7824.
13. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graph.* **14** (1996) 33–38.