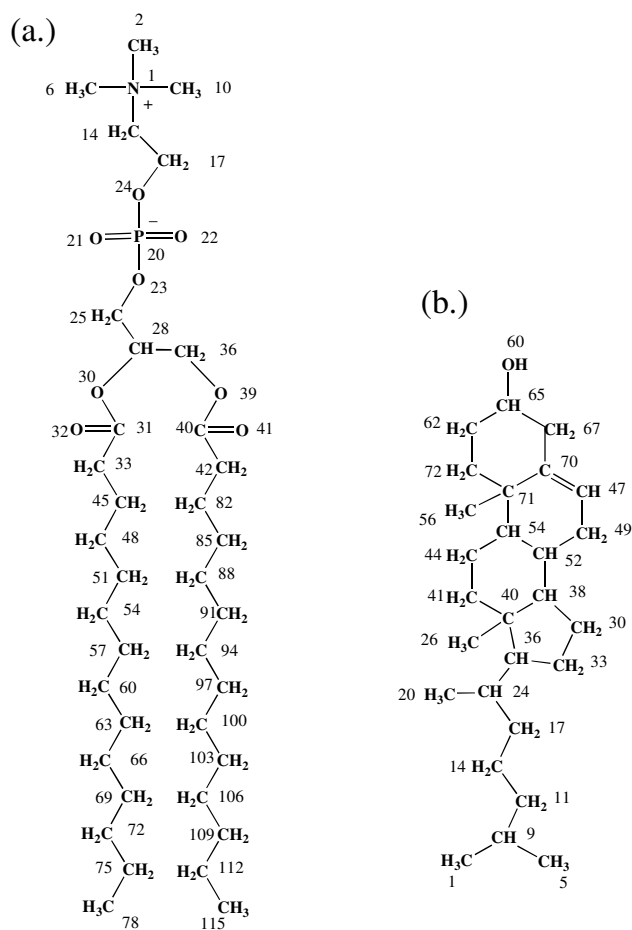


III.4. Lipid membránok vizsgálata

A foszfolipid molekulák az eukarióta sejtek membránjainak leggyakrabban előforduló komponensei. A sejtek minden kommunikációja a külvilággal (pl. anyagcsere, elektromos ingerek) vagy közvetlenül a membránon, vagy a membránban kötött molekulákon (pl. ioncsatornát alkotó fehérjék, jelvezető fehérjék) keresztül zajlik. Ezért a membrán szerkezetének és a benne zajló folyamatoknak a molekuláris szintű megismerése alapvető fontosságú a sejtek külvilággal való mindenféle kölcsönhatásának megértése szempontjából.

Az élő sejtek membránja igen sokféle molekula (különböző lipidek, kisebb apoláros molekulák, koleszterin, fehérjék, DNS szegmensek, stb.) rendkívül komplex együttese. A nagy



III.4.1. ábra (a) a DMPC és (b) a koleszterin molekula sematikus szerkezete. Az ábra az atomok jelen dolgozatban használt számozását is mutatja.

változatosságban előforduló különféle molekulák közül azonban a foszfolipideknek kiemelkedő jelentőségük van, hiszen mint a sejtmembrán leggyakrabban előforduló komponensei ők alkotják azt a közeget, ami a membrán többi molekuláját körülveszi. A tiszta foszfolipid membránok szerkezetének részletes megismerése ezért éppúgy elengedhetetlen előfeltétele a sejtmembránok tulajdonságainak molekuláris szintű megértésének, mint ahogy a tiszta víz szerkezetének részletes ismerete is szükséges a különféle komplex összetételű vizes oldatok tulajdonságainak molekuláris szintű értelmezéséhez. Ez a tény adja meg a lipid membránok kutatásának igazi jelentőségét a tudomány és az ipar számos területén a biotechnológiától a racionális gyógyszer-tervezésig.

Lipid membránok vizsgálatára irányuló kutatásaim során tiszta dimirisztoil-foszfatidilkolin (DMPC) membrán illetve

DMPC-koleszterin elegy membránok számítógépes szimulációs vizsgálatait végeztem. (A DMPC és a koleszterin molekula sematikus szerkezetét és atomjaiknak a későbbiek során használt számozását a III.4.1. ábra mutatja.) E munkák során részt vettem a Monte Carlo szimulációs módszer néhány, lipid membránok szimulációja során hasznosan alkalmazható metodológiai fejlesztésében, vizsgáltam a tiszta DMPC membrán fejcsoporti részének illetve a membránt hidratáló víznek a szerkezetét, koleszterin hatását DMPC membránok tulajdonságaira, kis molekulák oldódási szabadenergiájának változását a membrán normálisa mentén, illetve a vakanciák eloszlását és morfológiáját a különböző membránokban. E munkáim legfontosabb eredményeit ismerteti ez a fejezet.

III.4.1. Metodológiai fejlesztések

Az egyszerűbb rendszerekhez hasonlóan a foszfolipid membránok tulajdonságainak megismerésében is nagy szerepet játszhatnak a számítógépes szimulációs módszerek. E szimulációk időigénye azonban a rendszer bonyolultsága miatt lényegesen nagyobb a homogén kondenzált fázisok vagy a kis molekulás rendszerek közötti határfelületek szimulációjához szükségesnél. A foszfolipidek glicerinvázak molekulák, melyekben a glicerin két hidroxil csoportját két, általában 14-22 szénatomot tartalmazó, telített vagy telítetlen, esetleg rövidebb elágazásokat is tartalmazó nyílt láncú karbonsavak észtereszítik. Ezek a szénláncok alkotják a molekula apoláros farokrészét. A poláros fejcsoport általában foszfatidilkolin, azaz egy tetrametilammónium és egy dimetilfoszfát ion C-C kötéssel való összekapcsolódásával létrejött ikerion, mely a glicerinváz harmadik oxigénjéhez kapcsolódik. (A foszfolipid molekulák egyik reprezentánsának, a DMPC molekulának a szerkezetét lásd a III.4.1. ábrán.) Ezért a foszfolipidek által alkotott membránok erősen inhomogén rendszerek. A kettős rétegben egymás felé forduló farokcsoportok szénhidrogén-szerű apoláros fázist alkotnak, melyet két oldalról az ikerionos fejcsoportok erősen poláros rétege fog közre. Az ilyen membránok vizsgálatánál nem szabad megfeledkezni a rendszer harmadik rétegéről, a fejcsoportokat hidratáló vízről sem. Az említett inhomogenitás mellett a membrán kettősréteg szerkezete folytán egyúttal anizotróp rendszer is. Mindezek a tulajdonságuk önmagukban is jelentősen megnehezítik a lipid membránok szimulációs vizsgálatát, hiszen a homogén, izotróp rendszerekkel ellentétben a szimuláció során vett mintának a membrán normálisa mentén minden rétegben külön-külön is reprezentatívnak kell lennie. Tovább nehezíti a helyzetet a membránban zajló mozgások karakterisztikus idejének széles skálája. Így például a vízmolekulák fluxusa a membránon keresztül a 10^{-6} – 10^{-7} molekula/ns Å² nagyságrendbe esik, ami a konvencionális molekuláris dinamikai szimulációk által vizsgálható

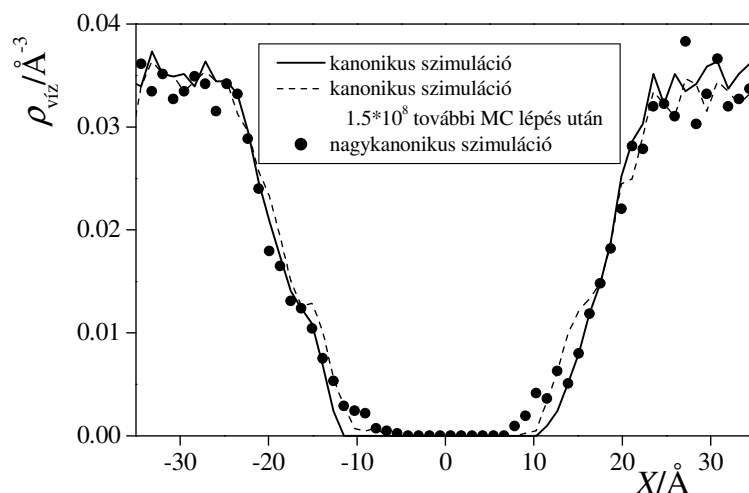
méret- és időskálán (kb. 10^{-4} Å² és 1 ns) egyetlen vízmolekula membránon való áthaladásának megfigyelését sem teszi lehetővé. Hasonlóképpen, a lipid molekulák rotációjának időskálája három–négy nagyságrenddel nagyobb a kötések vibrációjánál. Mindezek nem csak a folyamatokat a valódi, fizikai időskálán modellező MD szimulációkat nehezítik meg, a fenti jelenségek okai lassúvá teszik a konfigurációs térben MC szimuláció során végzett bolyongást is. Ezért a lipid membránok szimulációja csak az utóbbi egy-másfél évtizedben, a kellően nagy teljesítményű számítógépek megjelenésével és elterjedésével vált lehetségessé.

Mindazonáltal az ilyen számításokban még mindig nagy szerepet kapnak a különféle bonyolultabb, a mintavételezés hatékonyságát javító Monte Carlo technikák, alkalmasan választott irányított mintavételezések (pl. konfigurációs irányított mintavételezés [58,251], egymást követő több (legalább hat) torzió egyidejű változtatása [252], stb.). Munkám során több ilyen technika alkalmasságának demonstrálásában (pl. nagykanonikus sokaságon végzett MC szimuláció) illetve kifejlesztésében (kiterjedés szerint irányított forgatás [253], üregbeillesztéses Widom (Cavity Insertion Widom, CIW) módszer oldódási szabadenergia számításához [254]) vettem részt. A jelen fejezetben ezeket a módszereket tárgyalom részletesen.

III.4.1.1. A nagykanonikus Monte Carlo módszer alkalmazása

A nagykanonikus sokaságon végzett Monte Carlo szimulációk egyik legfőbb előnye, hogy e módszerrel egyszerűen és gyorsan biztosítható az egyes komponensek kémiai egyensúlya a rendszer egymástól többé-kevésbé elszigetelt tartományai között. Ugyanakkor a módszer legfőbb korlátja a sikeres részecskehozzáadási lépések igen kis számában gyökerezik, ami az ilyen szimulációk elvégzését gyakorlati szempontból csak kis molekulákra teszi lehetővé. Lipid membránok esetében a szimulációt a vízmolekulákra nézve elvégezhetjük nagykanonikus módon, míg a lipid molekulák számát állandó értéken kell tartanunk. Ez a módszer igen alkalmas például a vízmolekulák membránba történő behatolásának gyors szimulációjára. Ezt illusztrálja a III.4.2. ábra, mely a vízmolekulák darabszámsűrűségének profilját mutatja egy általunk szimulált, 50 DMPC molekulából álló hidratált membránban. A profilt kiszámítottuk mind a nagykanonikus, mind pedig a kanonikus sokaságon végzett, 10^7 MC lépés hosszúságú szimuláció alapján is. Noha a két futást azonos kiindulási konfigurációból indítottuk, mely látszólag már egyensúlyba jutott (a kanonikus sokaságon végzett előzetes ekvilibráció során a rendszer energiája már láthatóan nem változott), a kapott profilok mégis eltérnek egymástól, a nagykanonikus futás során a vízmolekulák lényegesen, kb. 5 Å-mel mélyebben hatoltak be a lipid láncok közé mint a kanonikus futásnál. Ez természetesen azt jelenti, hogy a rendszer a futás kezdetén még nem érte el az egyensúlyi szerkezetet. A 10^7 MC lépés hosszúságú kanonikus szimulációt megismételtük úgy is, hogy az

előző futás végén kapott konfigurációt további 1.5×10^8 lépésen át ekvilibráltuk. Az így kapott profil a vízmolekulák egyértelműen mélyebb behatolását mutatja, mint amit az előző kanonikus futás során tapasztaltunk, azonban a nagykanonikus futás során kapott profil még ennél is mélyebb behatolást mutat. A fenti eredmények azt demonstrálják, hogy a vízmolekulák lipid láncok közé való behatolásának, és így a víz membránon keresztüli egyensúlyi sűrűségprofiljának vizsgálata során a rendszer számunkra releváns tulajdonságát (a vízmolekulák eloszlását) több mint egy nagyságrenddel gyorsabban ekvilibrálhatjuk, ha a szimulációt kanonikus helyett nagykanonikus sokaságon végezzük.



III.4.2. ábra A vízmolekulák darabszámsűrűség-profilja 50 DMPC molekulából álló hidratált kettős-rétegben. Az egyes profilokat 10^7 lépésből álló szimuláció során számítottuk.

III.4.1.2. Kiterjedés szerint irányított forgatás

A lipid membránok Monte Carlo szimulációjának hatékonysága szempontjából kiemelkedően fontos a forgatási lépések, elsősorban a torziós forgatások hatékony elvégzése. Nyilvánvaló, hogy minél jobban belesimul a forgatott molekula vagy molekularészlet a forgatás tengelyébe, annál kisebb elmozdulást jelent a forgatott atomok számára egy adott szöggel való elforgatás, és így annál nagyobb szögű forgatások válnak várhatóan sikeresen elvégezhetővé. Ezt használja ki a forgatási lépések általunk javasolt, kiterjedés szerinti irányítása. Ennek a változó lépésméretű módszerek családjába tartozó eljárásnak a lényege az, hogy a forgatott molekula vagy molekularészlet forgástengelyre merőleges irányú legnagyobb kiterjedésének, azaz a forgástengelytől legtávolabb eső forgatott atom tengelytől való R_{max} távolságának függvényében állapítjuk meg az elforgatási kísérlet $\Delta\alpha_{\text{max}}$ maximális szögét. A $\Delta\alpha_{\text{max}}$ paraméter R_{max} -tól való több lehetséges függését tesztelve a

$$\Delta\alpha_{\text{max}} = \frac{c}{\sqrt{R_{\text{max}}}} \quad (\text{III.4.1})$$

kapcsolat bizonyult a leghatékonyabbnak, ahol c a lépésméretet szabályozó konstans. A módszer nagy előnye, hogy ha egy Monte Carlo lépésben csak egyetlen forgatást végzünk (azaz például nem változtatunk meg egyidejűleg több torziós szöget), akkor alkalmazása nem sérti a mikroszkopikus reverzibilitás II.2.19. egyenlettel megfogalmazott elvét, hiszen a lépésméretet szabályozó mennyiség, $R_{\max}$ a forgatás során nem változik. Ezért ilyenkor az eredeti Metropolis féle elfogadási kritériumot (II.2.17 egyenlet) változatlan formában alkalmazhatjuk, és így a módszer használata gyakorlatilag nem jár a számítás időigényének növekedésével.

A módszer hatékonyságának demonstrálására 10^5 Monte Carlo lépésből álló szimulációt végeztünk 50 DMPC molekulából álló hidratált kettősrétegre mind irányítatlan, mind pedig kiterjedés szerint irányított forgatásokkal. A teljes molekulák illetve molekularészletek maximális forgatását leíró paramétert (az elforgatás $\Delta\alpha_{\max}$ maximális szöge illetve a III.4.1. egyenlet c paramétere), valamint a teljes molekulák és molekularészletek forgatásának a relatív gyakoriságát a két szimulációban egymástól függetlenül optimaltunk. Az egyes forgatási technikák hatékonyságát a következő paraméterekkel jellemeztük: α_x , α_y és α_z jelenti az egyes lipid molekulák teljes elfordulását a szimuláció során az x , y és z tengely mentén (a membrán az yz síkban fekszik), D_T , D_{HG} és D_{ch} pedig a teljes lipid molekulák illetve fejcsoporti részük és két szénhidrogénláncuk szerkezetének a torziós forgatások hatására bekövetkezett változását. Ez utóbbi mennyiségeket úgy számítottuk ki, hogy az egyes molekulák glicerinvázát a szimuláció kezdeti és végső konfigurációjában egymással fedésbe hoztuk (eliminálva ezáltal a teljes molekula translációja és rotációja okozta változásokat), majd a molekula vagy a megfelelő molekularészlet összes atomja így számított elmozdulásának a négyzetösszegéből négyzetgyököt vontunk. A fenti paramétereknek a két szimulációban kapott értékét a III.4.1. táblázat foglalja össze. Látható, hogy a forgatás kiterjedés szerinti irányítása a mintavételezés hatékonyságát jellemző fenti paraméterek értékének a 15–25%-os növekedéséhez vezetett.

forgatás módja	α_x/fok	α_y/fok	α_z/fok	$D_T/\text{\AA}$	$D_{HG}/\text{\AA}$	$D_{ch}/\text{\AA}$
kiterjedés szerint irányított	2.23	3.06	3.19	8.01	3.29	6.88
irányítatlan	1.82	2.43	2.60	6.68	2.64	5.92

III.4.1. táblázat A kiterjedés szerint irányított és irányítatlan forgatási lépések hatékonyságának összehasonlítása hidratált DMPC membrán szimulációjánál. Az egyes paraméterek definícióját lásd a szövegben.

III.4.1.3. Az üregbeillesztéses Widom (*Cavity Insertion Widom, CIW*) módszer

Az élő sejtek membránjain kis, semleges molekulák egész sora tud áthatolni transzportfehérjék segítségével nélkül, passzív transzporttal, azaz egyszerű diffúzióval. Sok ilyen molekulának van kiemelkedően jelentős élettani funkciója vagy káros élettani hatása, mely elképzelhetetlen lenne a fenti képességük nélkül. Így például légzőrendszerünk teljes működése a CO₂ és O₂ molekuláknak a vörösvérsejtek és a külső légkör közötti folyamatos áramlásán alapul. A CO molekulák erősen mérgező hatásukat az ugyanilyen áramlásra való képességük révén tudják kifejteni. Az anesztetikumok (pl. N₂O, CHCl₃) hatásmechanizmusa az ilyen molekulák azon tulajdonságán alapul, hogy hosszabb ideig oldott állapotban képesek maradni a membrán belsejében, és onnan csak lassan (néhány óra alatt) ürülnek ki. Az NO molekula membránon keresztüli gyors áthatolásra való képessége a vérnyomásszabályozó rendszer [255], míg egyes bomlástermékeké (pl. ammónia, karbamid) a kiválasztási rendszer működésének alapvető feltétele.

Az ilyen molekulák membránon keresztül történő diffúziója azonban a már említett okok folytán (a szimulációkban elérhető méret- és időskálához képesti kis fluxusuk miatt) számítógépes szimulációs módszerekkel közvetlenül nem tanulmányozható. A passzív transzport folyamatának termodinamikai háttere azonban vizsgálható a molekulák membránbeli oldódási szabadenergia-profiljának kiszámításával. A lipid membránok szimulációjának már említett nehézségei (inhomogenitás, anizotrópia, a lipid molekulák konformációs változásának lassúsága) azonban a homogén vizes közegben jól működő, oldódási szabadenergia számítására alkalmas módszerek jelentős részét (pl. termodinamikai integrálás) a membránban használhatatlanná teszik. Noha bizonyos módszerek alkalmasak lehetnek adott típusú molekulák adott membránrétegben való oldódási szabadenergia profiljának a kiszámítására (pl. apoláros molekulák oldódási szabadenergia-profilja meghatározható a membrán apoláros fázisában "umbrella sampling" eljárással), az egyetlen olyan módszer, amelyik alkalmas lehet kis molekulák oldódási szabadenergia-profiljának a teljes membránon keresztül történő kiszámítására a II.2.7.3. fejezetben részletesen tárgyalt Widom-féle tesztészecske-beillesztési módszer [70]. Azonban az ilyen típusú számítások időigényét is jelentősen megnöveli az a tény, hogy a membrán anizotrópiája miatt az eredmény egy profil és nem egyetlen számérték, azaz a II.2.70. egyenletben szereplő mintavételezésnek és átlagolásnak a membrán minden egyes rétegében külön-külön is megfelelően pontosnak kell lennie. Az ilyen számítások hatékonyságának növelése érdekében dolgoztuk ki a módszer üregbeillesztéses változatát. (A továbbiakban a módszer jelölésére angol nevének – Cavity Insertion Widom – rövidítését, CIW-et használom.) A CIW módszer hasonló elven alapul, mint a nagykanonikus Monte Carlo szimulációkban a részecskehozzáadási lépés során alkalmazott üreg szerinti irányítás (II.2.4. fejezet) [51,52], azaz a tesztészecskét rendszerünknek csak olyan

pontjaiba próbáljuk meg beilleszteni, amelyek egy R_{cav} sugarú üreg belsejében található, azaz R_{cav} távolságon belül nincsen körülöttük egyetlen atom középpontja sem. Ilymódon drasztikusan csökkenthető a nagy energiájú, és így a II.2.70. egyenletben szereplő sokaságtághoz elenyészően kis (gyakorlatilag nulla) súllyal hozzájáruló beillesztések száma. Ebben az esetben a módszer egy olyan egy lépéses szabadenergia-perturbációs számításnak felel meg, melynek során a rendszerben található R_{cav} sugarú üreget változtatjuk a vizsgált molekulává. (Mint a II.2.7.3. fejezetben említettük, az eredeti Widom módszer tulajdonképpen olyan egy lépéses szabadenergia-perturbációs számítás, melyben a vizsgált molekulát ideális gáz állapotból oldott állapotba visszük.) Ezért a számítások során az üregek keletkezésének szabadenergiáját is figyelembe kell venni. Ennek megfelelően az eredeti II.2.70. egyenlet a következőképpen módosul:

$$A = -k_B T \int \ln \langle \exp(-\beta U_{N+1}) \rangle_N d\mathbf{s}_{N+1} - k_B T \ln \langle P_{\text{cav}} \rangle, \quad (\text{III.4.2})$$

ahol P_{cav} a megfelelő, legalább R_{cav} sugarú üregek előfordulásának a valószínűsége. Az oldódási szabadenergia profiljának membránban való számításakor az A , U_{N+1} és P_{cav} mennyiségek mindegyike természetesen a membrán normálisa mentén való elhelyezkedés függvénye. P_{cav} értékét a számítás során egyszerűen megkaphatjuk mint a beillesztéshez szükséges tesztpontok keresése során talált megfelelő, legalább R_{cav} sugarú üregekben elhelyezkedő tesztpontok és az összes vizsgált tesztpont hányadosát. Mivel a számítás során a megfelelő egyensúlyi trajektória (melyen a CIW számítást elvégezhetjük) előállítás, illetve a megfelelő üregek keresése a sebességmeghatározó lépés, az ilyen számításokat egy helyett több molekula szabadenergia-profiljának egyidejű kiszámítására viszonylag kis számításigény-többlet mellett egyszerűen kiterjeszthetjük.

A CIW módszer pontosságát nyolc, különböző méretű és polaritású kis molekula (O_2 , CO , CO_2 , NO , H_2O , NH_3 , CHCl_3 , formamid) vízben való oldódási szabadenergiájának számítása során teszteltünk. A számításokat egy 107 vízmolekulából álló, 310 K hőmérsékletű rendszer 40000 egyensúlyi mintakonfigurációján végeztük az eredeti Widom módszerrel, illetve a CIW módszerrel két különböző R_{cav} érték, 2.6 Å és 2.8 Å mellett is. A beillesztéseket az eredeti Widom módszerrel végzett számításnál egy $15 \times 15 \times 15$ pontból álló rács pontjaiban végeztük el, míg a CIW számítások során a megfelelő üregeket egy $60 \times 60 \times 60$ pontból álló rács pontjaiban kerestük. A CIW számítás időigénye az R_{cav} paraméter 2.6 Å értéke mellett 10%-kal, míg $R_{\text{cav}} = 2.8$ Å esetén 75%-kal volt kevesebb az eredeti Widom módszerrel végzett számításénál. Az oldódási szabadenergia értékét meghatároztuk a homogén, izotróp rendszerekben igen pontosan és gyorsan alkalmazható termodinamikai integrálás (TI) módszerével is, az így kapott adatokat

referenciaértékeknek tekintettük. Víz esetén a szabadenergiát nagykanonikus (μ, V, T) sokaságon végzett Monte Carlo szimulációval is meghatároztuk a kémiai potenciál azon értékéből, amellyel a szimulációt elvégezve a rendszer átlagosan éppen 108 részecskét tartalmazott. A kapott adatokat a III.4.2. táblázat foglalja össze. Látható, hogy a Widom-típusú módszerek viszonylag pontatlanok, alkalmazásuk ezért csak olyan esetekben (pl. lipid membránok) indokolt, ahol a pontosabb módszerek (pl. TI) gyakorlati okokból nem használhatók. Az üregbeillesztés alkalmazása nem csak a számítás időigényét csökkentette, hanem egyúttal pontosabbá is tette a módszert még a nagyobb R_{cav} érték használata mellett is. Az eredeti Widom módszerrel számított adatok nagyjából ± 4 -6 kJ/mol hibája a CIW módszer $R_{\text{cav}} = 2.6 \text{ \AA}$ érték melletti használatával ± 2 -3 kJ/mol értékre csökkent. Ezek a hibák azonban a legnagyobb molekulák (CHCl_3 , az eredeti Widom módszer használata mellett még a formamid is) esetében lényegesen nagyobbak adódtak, jelezve, hogy a Widom-típusú módszerek ennél nagyobb molekulákra már nem alkalmazhatóak, illetve hogy a CHCl_3 -ra és hasonló méretű molekulákra kapott adatok is csak legfeljebb félkvantitatív eredményeként értelmezhetők.

	(μ, V, T) MC	TI	Widom	CIW $R_{\text{cav}}=2.6 \text{ \AA}$	CIW $R_{\text{cav}}=2.8 \text{ \AA}$
H ₂ O	-24.1	-24.0 ± 2.8	-23.3	-22.6	-19.6
O ₂		11.8 ± 3.1	14.2	13.7	13.7
CO		13.8 ± 3.5	17.3	16.5	16.7
CO ₂		-0.1 ± 3.2	5.8	4.3	4.6
NO		9.6 ± 2.9	12.7	12.1	12.1
NH ₃		-13.5 ± 2.8	-7.4	-8.4	-6.3
CHCl ₃		5.5 ± 5.1	15.8	15.2	12.2
formamid		-34.0 ± 3.9	-22.7	-31.4	-26.2

III.4.2. táblázat Nyolc különböző molekula hidratációs szabadenergiája (kJ/mol egységben) 310 K hőmérsékleten különböző módszerekkel végzett számítások alapján.

III.4.2. A vízmolekulák orientációja tiszta DMPC membránban

A hidratált foszfolipid membránok különböző tulajdonságait (pl. szerkezet, szolvatálóképesség, permeabilitás) jelentős mértékben meghatározza a fejcsoporti részt körülvevő víz szerkezete. Ugyanakkor a membrán és a víz kölcsönhatása folytán ennek a vízrétegnek a szerkezetét a lipid molekulák jelenléte is erősen befolyásolja. Mindezek ellenére az ilyen irányú vizsgálatainkat megelőzően a membránt hidratáló vízréteg szerkezetének vizsgálatára viszonylag kevés figyelmet fordítottak az irodalomban.

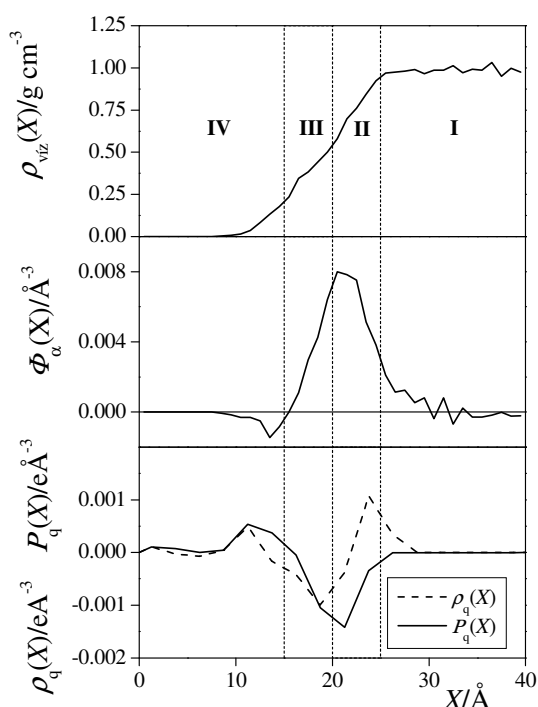
Vizsgálataink során rétegenként 25 DMPC molekulából álló hidratált kettősréteg szimulációját végeztük el izoterm-izobár (N, p, T) sokaságon 1 bar nyomáson és 310 K hőmérsékleten. (A rendszer ekvibrációjának első, 10^7 Monte Carlo lépés hosszúságú szakaszát nagykanonikus sokaságon végeztük.) Az izoterm-izobár szimuláció során a rendszer 2033 vízmolekulát tartalmazott, melyeket a TIP3P vízmodellel [150] írtunk le. A periodikus határfeltételeket úgy választottuk meg, hogy az egyes atomok eltolt képmásai közötti távolság a membránnal párhuzamos síkban maximális legyen, ezért a szimulációs dobozunk alakja szabályos hatszög alapú prizma volt. A DMPC molekulák geometriáját és a kölcsönhatásaikat jellemző paramétereket a fehérjék és foszfolipid molekulák modellezésére kifejlesztett CHARMM22 erőteréből [12,13] vettük. E modell a lipid molekula minden atomját külön kezeli, a kötéshosszak és kötésszögek értéke rögzített, a torziós szögek viszont változhatnak. A számításokat az MMC programcsomag [256] segítségével végeztük el. A szimuláció során víz és lipid mozdítási, illetve térfogatváltoztatási lépések váltakoztak. Minden víz mozdítási lépés után egy lipid mozdítás következett, és minden 625 ilyen lépéspárt egy térfogatváltoztatási lépés követett. A víz mozdítása során egy vízmolekulával véletlenszerű irányba és $0.3 \text{ \AA}$ -nél kisebb véletlen távolságra translációt végeztünk, majd a molekulát elforgattuk egy 20° -nál kisebb véletlen szöggel egy véletlenszerűen választott térbeli tengely körül. A mozdítandó vízmolekulákat véletlenszerűen választottuk ki úgy, hogy a membránhoz közelebb eső molekulák nagyobb valószínűséggel kerüljenek sorra, mint a membrántól távoliak. A lipid mozdítások során vagy egy lipid molekulával végeztünk a vízmolekulákéhoz hasonló véletlen translációt és rotációt, vagy a molekula egyik torziós szögét változtattuk meg. A kétféle mozdítást 20% illetve 80% valószínűséggel végeztük el. A mozdítandó molekula kiválasztása során ciklikusan végigmentünk mind az 50 molekulán, azonban egy-egy cikluson belül a molekulák sorrendjét véletlenszerűen választottuk meg [257]. A mozdítandó torzió kiválasztásakor sorban haladtunk a molekula egyes láncainak torziós tengelyein a láncok végétől a molekula közepe felé, azonban a soron következő torziót csak adott, torzióként változó valószínűséggel választottuk ki, lehetővé téve ezáltal, hogy a lánc végén levő torziókat ritkábban változtassuk, mint a molekula közepéhez közeliakat [253]. Egy-egy térfogatváltoztatási lépés során felváltva vagy a prizma alakú szimulációs doboz magasságát, vagy a szabályos hatszög alakú alaplap élhosszát változtattuk meg véletlenszerűen úgy, hogy az egész rendszer térfogata ne változzon többet $800 \text{ \AA}^3$ -nél. Ily módon a lipid molekulák felületi sűrűségét és a teljes rendszer térfogati sűrűségét egymástól függetlenül tudtuk egyensúlyba hozni. A vízmolekulák illetve teljes lipid molekulák megkísérelt elmozdításainak és a megkísérelt térfogatváltoztatásoknak körülbelül az 50, 25, ill. 35%-a volt sikeres. A sikeres torzió változtatási kísérletek aránya torzióként változott, nagyjából 15% és 35% között. A rendszer egyensúlyának eléréséig $7 \cdot 10^7$ Monte Carlo

lépést végeztünk el. Ezután 1000, egymástól 10^5 Monte Carlo lépés távolságra lévő mintakonfigurációt mentettünk el a további vizsgálatokhoz.

III.4.2.1. A vízmolekulák membránhoz viszonyított orientációja

A vízmolekulák membránhoz viszonyított orientációját dipólusmomentum vektoroknak a membrán apoláros fázis felé mutató $\underline{X}$ normálvektorával mint referenciavektorral bezárt α szögével (III.3.1. ábra) jellemeztük. (Kiszámítottuk a vízmolekulák orientációját jellemző, III.3.1.1. fejezetben definiált $\cos\vartheta$ és ϕ polárkoordináták (III.3.1. ábra) együttes eloszlását is, azonban ez az eloszlás a membrán minden rétegében és minden $\cos\vartheta$ értéknél gyakorlatilag ϕ -től függetlennek bizonyult.)

A vízmolekulák dipólusmomentum vektorának III.3.1. egyenlettel definiált, és membrán két oldalára átlagolt $\Phi_\alpha(X)$ orientációs profilját a III.4.3. ábra mutatja. Az ábrán feltüntettük a vízmolekulák darabszámsűrűségének $\rho_w(X)$ profilját is. Látható, hogy a $\Phi_\alpha(X)$ profil a membrán középpontjától (az $X = 0 \text{ \AA}$ helyzettől) $20 \text{ \AA}$ távolságra maximumon megy át, majd a membrán belseje felé haladva csökken, a membrán középpontjától $15 \text{ \AA}$ távolságra pedig előjelet vált. A $\Phi_\alpha(X)$ profil lefutása alapján a következő vizsgálatokhoz a membránt négy rétegre osztottuk. Az $X > 25 \text{ \AA}$ tartományban lévő I réteg tömbfázisbeli víz, itt a víz sűrűsége eléri a tömbfázisbeli értéket, $\Phi_\alpha(X)$ pedig 0 érték körül fluktuál, jelezve, hogy a membrán hatása a vízmolekulák orientációjára e tartományban már elenyésző. A $20 \text{ \AA} < X < 25 \text{ \AA}$ távolságtartományt lefedő II rétegben $\Phi_\alpha(X)$ a membrán közepe felé haladva folyamatosan nő. Az orientációs profil értéke a membrán közepétől $15 - 20 \text{ \AA}$ távolságra lévő III rétegben is pozitív, azonban itt már a membrán belseje felé haladva csökken, míg a IV rétegben, az $X < 15 \text{ \AA}$ tartományban negatívvá válik. Mind a négy rétegben kiszámítottuk $\cos\alpha$ eloszlását is, az eredményeket a III.4.4. ábra



III.4.3. ábra A vízmolekulák sűrűség-profilja (felső panel) és $\Phi_\alpha(X)$ orientációs profilja (középső panel), valamint a lipid molekulák $\rho_q(X)$ töltéssűrűség-profilja és ennek $P_q(X)$ integrálja (alsó panel) a membrán normálisa mentén. Az ábrázolt profileket a membrán két oldalára átlagoltuk. A szaggatott függőleges vonalak a rendszer négy rétegre osztását szemléltetik.

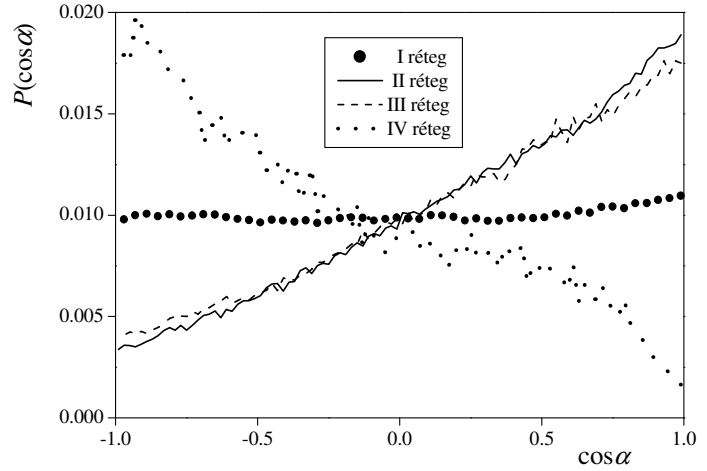
mutatja. Látható, hogy az eloszlás minden rétegben vagy monoton változó, vagy egyenletes, így a $\Phi_\alpha(X)$ profil pozitív ill. negatív értékeit esetünkben valóban értelmezhetjük a vízmolekulák dipólusmomentum vektorának a membrán normálisa mentén a membrán belseje illetve a vizes fázis felé mutató orientációra vonatkozó preferenciájaként. Így tehát a vízmolekulák dipólusmomentum vektora a II és III rétegben preferáltan a membrán

belseje felé mutat, és ez a preferencia a két réteg határán, $X = 20$ Å-nél a legerősebb, míg a IV rétegben az orientációs preferencia ezzel éppen ellentétes.

A $\Phi_\alpha(X)$ profil lefutásának értelmezéséhez kiszámítottuk a rendszerben lévő lipid molekuláknak az atomjaik parciális töltéseitől származó $\rho_q(X)$ töltéssűrűség-profilját, illetve ennek $P_q(X)$ integrálját a membrán közepétől a vizes fázis felé haladva:

$$P_q(X) = \int_0^X \rho_q(x) dx. \quad (\text{III.4.3})$$

A membrán két oldalára szimmetrizálva kapott $\rho_q(X)$ és $P_q(X)$ profilokat a III.4.3. ábra alsó panelje mutatja. Látható, hogy a töltéssűrűség-profil $X = 18$ Å-nél minimumon, míg $X = 23$ Å-nél maximumon megy át. E két X érték megfelel a negatív töltésű dimetilfoszfát illetve pozitív töltésű tetrametilammónium csoportok membrán közepétől való átlagos távolságának. A $18 \text{ Å} < X < 23 \text{ Å}$ helyzetű vízmolekulák tehát két párhuzamos, ellentétes töltésű réteg között helyezkednek el, és így dipólusmomentum vektorukkal preferáltan a negatív töltésű, tőlük a membrán belseje felé eső réteg felé fordulnak. Azonban a vízmolekulák ezt az orientációs preferenciát egy ennél lényegesen szélesebb rétegben, a $15 \text{ Å} < X < 25 \text{ Å}$ tartományban mutatják. Ennek a ténynek a megértésében a $P_q(X)$ profil lehet a segítségünkre. Amint az a III.4.3. ábráról látható, $\Phi_\alpha(X)$ ellentétes előjellel pontosan követi a $P_q(X)$ profil lefutását. A membrán közepétől 15-25 Å távolságra $P_q(X)$ negatív, vagyis az itt elhelyezkedő vízmolekulák negatív *eredő* töltést érzékelnek a membrán közepe (és így pozitív *eredő* töltést a vizes fázis) irányából, és ezért dipólusmomentum vektorukkal preferáltan az *eredő* negatív töltés, vagyis a membrán belseje felé fordulnak az egész



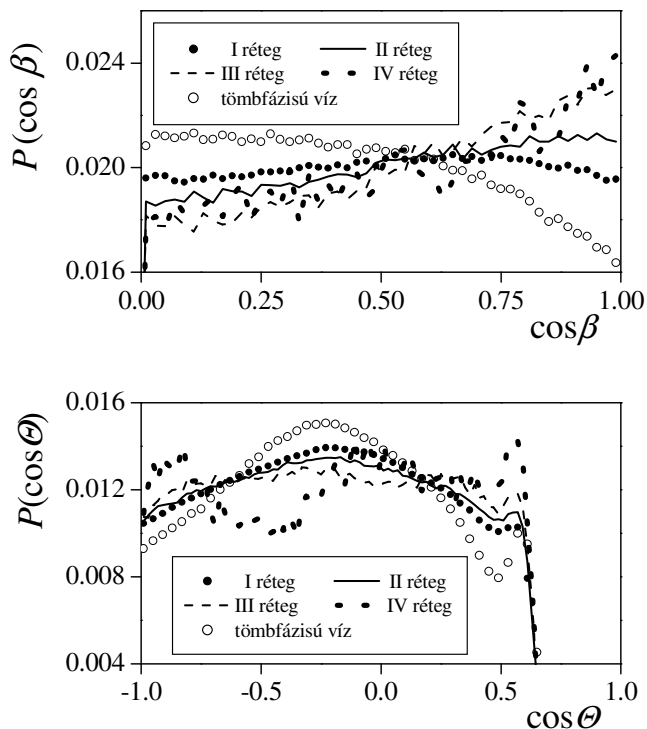
III.4.4. ábra A vízmolekulák dipólusmomentum vektorának orientációját leíró $\cos \alpha$ paraméter egyváltozós eloszlásai a membrán egyes rétegekben.

tartományban. Az $X < 15$ Å tartományban azonban $P_q(X)$ pozitívvá válik. Itt tehát a vízmolekulák a membrán belseje felől érzékelnek eredő pozitív, a vizes fázis felől pedig eredő negatív töltést, dipólusmomentum vektoruk preferált iránya pedig ennek megfelelően a vizes fázis felé mutat.

III.4.2.2. A szomszédos vízmolekulák relatív orientációja

Kiszámítottuk a szomszédos vízmolekulák dipólusmomentum vektorai, illetve síkjai (normálvektorai) által bezárt szögek, egy vízmolekula két szomszédjának O atomja által a központi vízmolekula O atomja körül bezárt szög ($O^{\cdots}O^{\cdots}O$ szög), valamint az egymással hidrogénkötésben lévő vízmolekulák hidrogénkötésének $H-O^{\cdots}O$ szöge (azaz a H-donor molekula O-H kötése és a két O atomot összekötő tengely által bezárt szög) koszinuszának eloszlását a membrán hidratált részének előzőekben definiált mind a négy rétegében. A számításokat elvégeztük tiszta tömbfázisbeli vízben mint referenciarendszerben is. Két vízmolekulát akkor tekintettünk egymással szomszédosnak, ha O atomjaik távolsága kisebb volt 3.3 Å-nél, azaz a vízmolekulák első koordinációs szférájának határánál, és akkor tekintettünk egymással hidrogénkötésben lévőnek, ha ezen kívül az egyik (donor) molekula valamelyik H atomja 2.5 Å-nél közelebb volt a másik (akceptor) molekula O atomjához.

A szomszédos molekulák dipólusmomentum vektorai által bezárt szögnek illetve a hidrogénkötés szögének az eloszlása nem mutatott függést a molekuláknak a membrán normálisa mentén való elhelyezkedésétől, a szomszédos molekulák síkjai által bezárt β és a Θ -val jelölt $O^{\cdots}O^{\cdots}O$ szög eloszlása viszont igen. Ezeket az eloszlásokat mutatja a III.4.5. ábra. Látható, hogy tömbfázisbeli vízben a $P(\cos\beta)$ eloszlás nagyjából egyenletes 0 és 0.6 közötti $\cos\beta$ értékeknél, majd 0.6 fölött monoton csökken. Ennek oka az, hogy a molekulák pontosan négyszeres koordinációját, szigorúan lineáris hidrogénkötéseket és a hidrogénkötéses szomszédok pontosan tetraéderes elrendeződését feltételezve $\cos\gamma$ értéke nem lehet nagyobb 0.57-nél. A $P(\cos\beta)$ eloszlás 0.57 feletti része az ilyen ideálisan rendezett hidrogénkötéses szerkezettől való eltérésekből adódik. Látható, hogy a hidrogénkötéses szerkezet torzulása a membrán belseje felé haladva erősödik, és a II rétegtől kezdve a szomszédos molekulák egymással preferáltan párhuzamosan állnak. Ez a preferencia a membrán belseje felé haladva erősödik. Mivel a hidrogénkötés szögének eloszlása nem mutat változást a membrán normálisa mentén, vagyis a hidrogénkötések lineáris elrendeződése még a IV rétegben is éppoly erősen preferált, mint tiszta, tömbfázisbeli vízben, így a fenti torzulások hatásának elsősorban a szomszédok egymás körüli térbeli elrendeződésének megváltozásában kell megnyilvánulnia. Ezeket a változásokat tükrözik a membrán különböző rétegeiben kapott $P(\cos\Theta)$ eloszlások.



III.4.5. ábra A szomszédos vízmolekulák síkjai (normálvektorai) által bezárt β szög (felső panel) illetve egy vízmolekula két szomszédjának O atomja által a központi vízmolekula O atomja körül bezárt Θ szög ($\text{O}^{\text{---}}\text{O}^{\text{---}}\text{O}$ szög, alsó panel) koszinuszának eloszlása a membrán négy rétegében és tömbfázisú vízben.

fokozatos szétesésére utal. Végezetül a IV rétegben a tetraéderes csúcs helyett két új maximum jelenik meg a $P(\cos \Theta)$ görbén, a Θ szög 180° illetve 90° értékeinek megfelelő -1 ill. 0 $\cos \Theta$ értékek körül. E csúcsok jelenléte arra utal, hogy a szomszédos vízmolekulák itt már preferáltan planárisan koordinálódnak, közös síkba rendeződnek. Más szóval a lipid láncok közé fokozatosan behatoló vízmolekulákat a láncok előbb fokozatosan párhuzamos síkokba orientálják, majd a szomszédos molekulákat is síkszerű módon rendezik egymás köré.

III.4.3. A DMPC molekulák fejcsoportjának szerkezete tiszta DMPC membránban

A foszfolipid membránok legnagyobb sűrűségű és legerősebben poláros rétege az ikerionos fejcsoportok régiója, mely – éppen nagy sűrűsége és a benne található töltött csoportok révén – a membrán egy sor tulajdonságát meghatározza. Az előzőekben láttuk a töltött csoportok térbeli elrendeződésének hatását a membránt hidratáló vizek orientációjára. Hasonlóképpen, a membrán

Tömbfázisú vízben a $P(\cos \Theta)$ eloszlás a III.1. fejezetben részletesen tárgyalt okok miatt két maximumot mutat. Az első, széles csúcs -0.3 körül a tetraéderesen elhelyezkedő szomszédokra, míg a kicsi és éles csúcs $\cos \Theta = 0.5$ (azaz $\Theta = 60^\circ$) körül szoros illeszkedésű szerkezeti részletekre (melyekben három molekula érintkezik páronként közvetlenül, szabályos háromszöget alkotva), azaz az intersticiális molekulák jelenlétére utal. Látható, hogy a membrán belseje felé haladva a tetraéderes csúcs magassága fokozatosan csökken, és a III rétegben már lényegében teljesen el is tűnik, míg a $\cos \Theta = 0.5$ értéknél található csúcs magassága fokozatosan nő. Ez a tény az intersticiális szomszédok növekvő relatív gyakoriságára, végső soron pedig a víz hidrogénkötései szerkezetének

különböző kis molekulákra illetve ionokra vonatkozó permeabilitását is döntő mértékben határozhatják meg a fejcsoporti réteg tulajdonságai. A fejcsoporti réteg korábbi vizsgálatainak zöme a fejcsoport dipólusmomentum vektora (illetve az azt közelítő, a molekula P atomjából az N atomba mutató PN vektor) orientációjának a tárgyalására szorítkozott. E vizsgálatok arra a következtetésre jutottak, hogy a PN vektor nagyobb valószínűséggel mutat a vizes fázis irányába, mint a membrán belseje felé, habár az utóbbi típusú orientációk is viszonylag nagy gyakorisággal előfordulnak [258-263]. Pasenkiewicz-Gierula és munkatársai részletesen vizsgálták a lipid fejcsoportok lehetséges kapcsolódásait, és azt találták, hogy a szomszédos molekulák fejcsoportjai között a víz-hidas kapcsolódás (azaz amikor két lipid molekula fejcsoportja ugyanahhoz a hídszerepet betöltő vízmolekulához kapcsolódik hidrogénkötéssel) dominál az ellentétes töltésű fejcsoporti részek közvetlen töltés-töltés kölcsönhatáson alapuló kapcsolódásával szemben [262,264]

Munkánk során az ikerionos fejcsoporti rész ellentétesen töltött csoportjai középpontjának tekinthető N és P atomok egymáshoz viszonyított elrendeződését, valamint a fejcsoportok dipólusmomentum vektorát közelítő PN vektorok relatív orientációját vizsgáltuk részletesen. Annak a kérdésnek az eldöntése érdekében, hogy a megfigyelt tulajdonságok mennyiben következnek a membrán kettős rétegben elrendeződő szerkezetéből, illetve az ellentétes töltésű csoportokat ikerionná kapcsoló kémiai kötés okozta kényszerektől, számításainkat elvégeztük tetrametilammónium-dimetilfoszfát (TA-DP) 1 M, 2 M és 3 M töménységű, illetve *o*-foszforilkolin (*o*-PC), azaz a két ionos csoport összekapcsolódásával keletkező ikerion 2 M töménységű vizes oldatán, mint referenciarendszereken is.

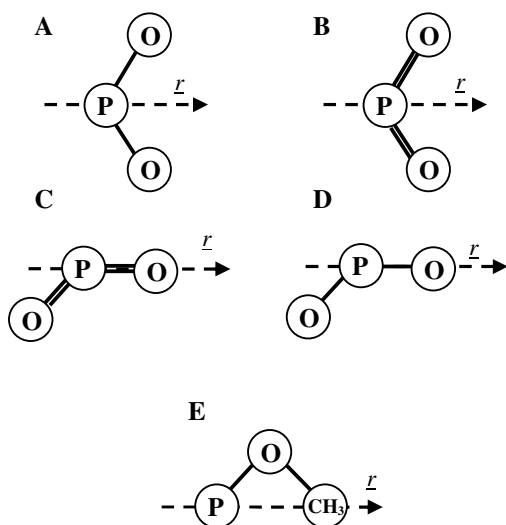
III.4.3.1. Az ionos csoportok egymás körüli elrendeződése

Az ionos csoportok egymás körüli elrendeződésének vizsgálata érdekében kiszámítottuk a P-P, P-N illetve N-N atompárok $g_{ij}(r)$ parciális párkorrelációs függvényét, illetve az ezen atompárok között ható átlagerő $w_{ij}(r)$ potenciálját, mely a $g_{ij}(r)$ függvényből a

$$w_{ij}(r) = -RT \ln g_{ij}(r) + C \quad (\text{III.4.4})$$

egyenlet szerint származtatható. (C egy additív konstans, melynek értékét az a feltétel határozza meg, hogy végtelen távoli ionpár esetén a köztük ható átlagerő w_{ij} potenciálja nulla.) Az egyes rendszerek szerkezetét azért célszerűbb a $w_{ij}(r)$ és nem a $g_{ij}(r)$ függvényeken keresztül összehasonlítani, mert az átlagerő potenciálja végtelenül híg oldatban (azaz olyan oldatban, mely az oldószeren kívül mindössze azt a két iont tartalmazza, amelyek között az átlagerő potenciáljára

kíváncsiak vagyunk) is kiszámítható szimulációs módszerekkel. E számítások elvégzése érdekében a két iont és 510 vízmolekulát helyeztünk egy téglalap alakú, $40.0 \text{ \AA} \times 20.0 \text{ \AA} \times 20.0 \text{ \AA}$ nagyságú szimulációs dobozba. Az egyik iont a doboz középpontjába helyeztük (a TA-DP ionpár esetén ez a TA ion volt), és a szimuláció során helyzetét rögzítettük. A másik ion a doboz hosszú oldalával párhuzamos X tengely mentén mozoghatott. Annak érdekében, hogy a szimuláció során vett mintánk az ionpár r távolságának kellően széles tartományát lefedje, a számításokat az adaptív umbrella sampling módszerrel [73] (II.2.7.4. fejezet) végeztük, vagyis a mozgó iont egy módosító potenciál segítségével a rögzített iontól adott távolságtartományban tartottuk úgy, hogy e tartományon belül az ionpár minden lehetséges távolsága azonos gyakorisággal forduljon elő, majd az ehhez szükséges módosító potenciál alakjából következtettünk vissza az egyes ion-ion távolságok előfordulási gyakoriságára. A számításokat mindegyik ionpár esetén öt ilyen, egymással páronként átfedő távolságtartományon végeztük el. Nyilvánvaló, hogy az eredmények elvileg függenek a rögzített ion X tengelyhez viszonyított orientációjától. A közel gömbszimmetrikus TA ion esetén azonban ez a függés csak igen csekély, ezért vizsgálataink során elhanyagoltuk. (A TA-TA illetve TA-DP ionpárra vonatkozó számítások során a TA iont úgy rögzítettük, hogy egyik kétfogású szimmetriatengelye egybeessen az X tengellyel.) A DP ionpár esetében azonban a számításokat a rögzített ion ötféle helyzetében (III.4.6. ábra) is elvégeztük.



III.4.6. ábra A központi (rögzített) DP ionnak a DP ionpár közt ható átlagerő potenciáljának számítása során használt ötféle helyzete. $\underline{r}$ a másik DP ion P atomja felé mutató vektor.

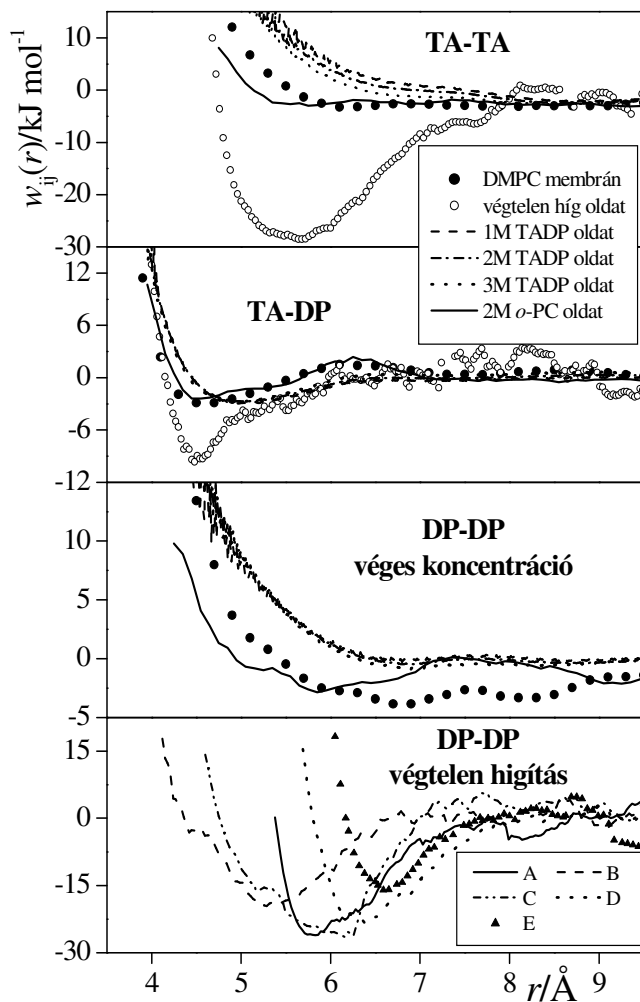
Az egyes számítások során kapott $w_{ij}(r)$ függvények összehasonlítását a III.4.7. ábra mutatja. Az ábráról látható, hogy az ionos csoportok hasonló módon rendeződnek el a DMPC membránban, mint a homogén rendszerekben. Ez a hasonlóság különösen az ionos csoportokat már ikerion formájában tartalmazó 2 M *o*-PC rendszer esetén szembetűnő. Az egyes csúcsok és minimumok helye és amplitúdója egyaránt jó egyezést mutat a legtöbb esetben. Az egyetlen kivétel a $w_{PP}(r)$ függvény két minimumának a helye, noha a két minimumot elválasztó potenciálgát helye már megegyezik a DMPC membránban és a 2 M *o*-PC oldatban.

A végtelen híg oldatban kapott $w_{NN}(r)$ függvény több szempontból is hasonlít az ikerionos

rendszerekben kapott görbékhez. A legfontosabb ilyen hasonlóság az, hogy az első minimum ezekben a rendszerekben, szemben a véges koncentrációjú homogén TA-DP ionos oldatokkal, a kontakt TA ionpárnak megfelelő $5.5 \text{ \AA}$ távolságnál jelentkezik. Ez az eredmény azzal az ismert ténnyel magyarázható, hogy a TA ionok végtelenül híg oldatban hidrofób részecskék módjára hidratálódnak [265]. A kontakt ionpárnak megfelelő minimum lényegesen mélyebb a végtelenül híg oldatban, mint az ikerionos rendszerekben, hiszen ez utóbbiakban az ionos csoportok közötti többrészecske-kölcsönhatások egyéb elrendeződéseket is kevésbé kedvezőtlené tesznek. Hasonló a helyzet az ellentétes töltésű ionpár esetében is: a végtelenül híg oldat $w_{NP}(r)$ görbéje – az első, kontakt ionpárokhöz tartozó, $4.6 \text{ \AA}$ -nél jelentkező minimum mélységétől eltekintve – igen hasonló az ikerionos rendszerekéhez.

A TA és DP ionos csoportok különböző rendszerekben való eltérő viselkedésének megértésében segítségünkre lehet a $w_{NN}(r)$ és $w_{NP}(r)$ görbék összevetése. Noha a $w_{ij}(r)$ függvényt a részecskék elrendeződése csak

egy additív konstans erejéig határozza meg (lásd a III.4.4. egyenletet), és e konstans értékére csak viszonylag pontatlan becslést tudunk adni azon feltétel alapján, hogy az ionok közötti kellően nagy távolság esetén $w_{ij}(r)$ értékének 0-hoz kell tartania, a III.4.7. ábráról mégis nyilvánvaló, hogy végtelenül híg oldatban a kontakt TA ionpár létrejöttéhez tartozó szabadenergia érték lényegesen, kb. 20 kJ/mol -al mélyebb, mint a kontakt TA-DP párok keletkezésének szabadenergiája. E meglepő eredmény a két ionpár egymástól nagyon eltérő hidratációjával magyarázható. A hidrofób



III.4.7. ábra TA illetve DP ionok közt ható átlagerő potenciálja különböző rendszerekben. Felső panel: TA ion pár, második panel: TA-DP pár, harmadik panel: DP ion pár a vizsgált véges töménységű rendszerekben, alsó panel: DP ion pár végtelen híg oldatban, a központi (rögzített) ion ötféle orientációja mellett elvégzett számítással. Az ikerionos rendszerekben az azonos molekulához tartozó TA-DP ionpár közti átlagerő potenciálját nem vettük figyelembe.

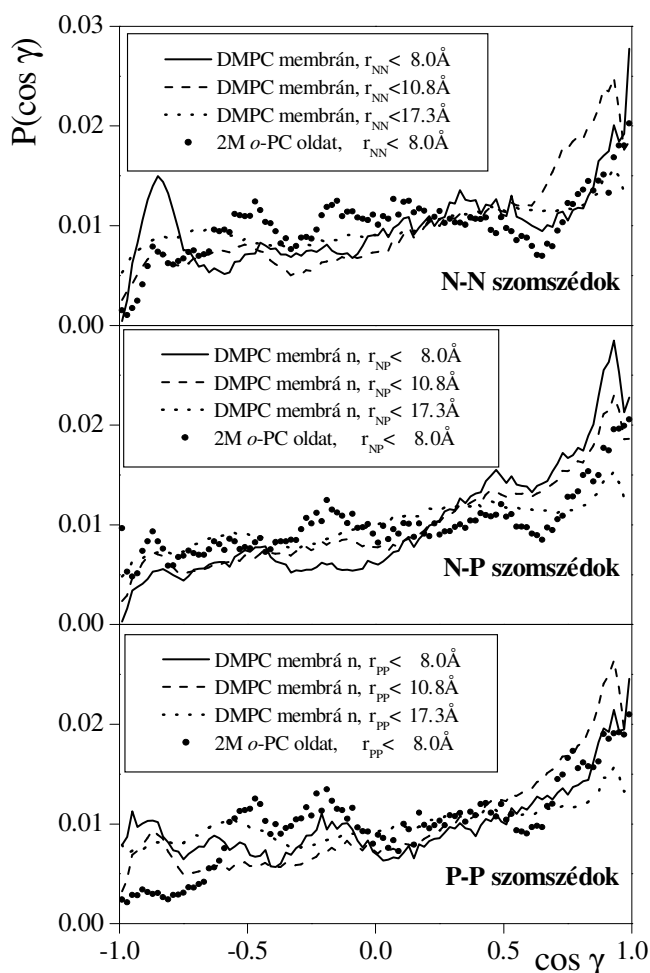
módon hidratálódó TA ionokkal ellentétben a DP ionok hidratációja erősen hidrofíli jellegű, ezek az ionok vízzel több hidrogénkötést is képesek egyidejűleg alkotni. A két ion hidratációjának ilyen különbsége kellően híg oldatokban elvileg akár lokálisan túl is kompenzálhatja az azonos töltésű ionok közötti elektrosztatikus taszítás hatását, az oldat szokatlan mikroszkopikus szerkezetét hozva ezáltal létre. (E lehetőség elméleti hátterét di Caprio és munkatársai tisztázták két dimenzióban [266].) A vizsgált véges koncentrációjú TA-DP oldatokban (vizsgálatainkat később 0.1 M töménységű TA-DP oldatban is megismételtük) azonban ilyen szokatlan szerkezetnek nem találtuk nyomát. Más szóval, a TA-TA és TA-DP kontakt ionpárok kialakulásának végtelenül híg oldatbeli szabadenergiája közötti kb. 20 kJ/mol különbség nem elegendő ahhoz, hogy az 1 M (vagy akár 0.1 M) töménységű TA-DP oldatban legyőzze a kellően nagy sűrűségű pozitív töltésű ionok közötti elektrosztatikus taszítást, és így a rendszerben észrevehető mennyiségű kontakt TA ionpár jelenjen meg. A TA ionok kontakt ionpár alkotására való képessége azonban meg tud nyilvánulni az ikerionos rendszerekben, ahol a hozzájuk kémiai kötéssel kapcsolódó ellentétes töltésű DP ionok képesek ezt a taszítást jobban árnyékolni, és így annak a hatását kellőképpen csökkenteni.

A $w_{PP}(r)$ görbék összehasonlítása a fentiekkel konzisztens képet mutat. A végtelenül híg oldatban kapott görbék első minimumának mélysége nagyjából azonos a $w_{NN}(r)$ függvényével. (A $w_{PP}(r)$ függvény első, 5.5 – 6.0 Å körül jelentkező első minimuma a mindkét ionhoz hidrogénkötéssel kapcsolódó vízmolekula által elválasztott DP ionpárnak felel meg.) A különböző orientációjú rögzített ionnal végzett számítások eredményeinek a DMPC membránban kapott görbével való összevetése alapján a DP párok membránbeli preferált relatív orientációjára nézve is vonhatunk le következtetéseket. Látható, hogy míg a 2M *o*-PC oldatban a $w_{PP}(r)$ függvény első minimumának helyzete a B illetve C orientációban (ahol a központi ion legalább az egyik kettős kötésű O atomjával fordul a mozgó ion felé) végzett számítások eredményeivel egyezik legjobban, addig a membránban kapott görbe minimuma a D és E orientáció (ahol a központi ion egy metil csoportja fordul a mozgó ion felé) esetén kapott minimumok helyzetéhez esik a legközelebb. Ez a különbség a lipid molekulák membránbeli kettősréteg szerkezetű elrendeződéséből eredő kényszerek következménye.

III.4.3.2. A szomszédos molekulák PN vektorainak relatív orientációja

A szomszédos fejcsoportok PN vektorainak relatív orientációját vizsgálandó kiszámítottuk az egymáshoz 8.0 Å, 10.8 Å illetve 17.3 Å távolságnál közelebbi fejcsoport párok PN vektorai által bezárt γ szög koszinuszának eloszlását. (A fenti távolságok a fejcsoportok átlagosan 2, 5 illetve 15 legközelebbi szomszédjának figyelembe vételét jelentették). A számításokat háromféle módon is elvégeztük, két fejcsoport távolságának a két N atom, a közelebbi N-P pár, illetve a két P atom

távolságát tekintve. (Az ezen definíciók szerinti szomszédokat a továbbiakban N-N, N-P ill. P-P szomszédoknak nevezzük.) A kapott $P(\cos \gamma)$ eloszlásokat a III.4.8. ábra mutatja. Látható, hogy az N-N, N-P illetve P-P párok esetén kapott eloszlások egymáshoz minden esetben igen hasonlóak. A szomszédos PN vektorok minden esetben az egymással párhuzamos orientációt preferálják. E preferencia erőssége nem változik lényegesen akkor, ha a legközelebbi kettő helyett öt szomszédot



III.4.8. ábra A szomszédos molekulák PN vektorai által bezárt γ szög koszinuszának eloszlása a különböző ikerionos rendszerekben.

egymás mellé rendeződő antiparallel orientáció dominanciáját várhatnánk). Az egymás mellé rendeződő parallel orientációk nagy gyakorisága nyilvánvalóan a membrán kettősréteg szerkezetével áll összefüggésben, melynek következtében a DMPC molekulák N atomjai a membrán közepétől átlagosan távolabb helyezkednek el, mint a P atomok, és így a PN vektorok nagyobb valószínűséggel mutatnak a vizes fázis felé, mint a membrán belseje irányába. Ez az

veszünk figyelembe, de már észrevehetően gyengül, ha a számításainkat átlagosan tizenöt szomszédra terjesztjük ki. Látható az is, hogy a párhuzamos orientáció preferenciája nem erősebb a P-N szomszédok között, mint az N-N vagy P-P párok esetében, ami a láncszerű elrendeződés (amikor az egyik molekula PN vektora N atomjával a másik molekula PN vektorának P atom felőli vége felé fordul) dominanciájának hiányára utal, és azt mutatja, hogy a PN vektorok egymás melletti párhuzamos elrendeződése legalább olyan jelentős szerepet játszik a membránban, mint a láncszerű párhuzamos állás. Ez az eredmény némiképp meglepőnek tűnik, hiszen a PN vektorok egymás melletti párhuzamos elrendeződésében az azonos töltésű csoportok egymás közelébe kerülnek (a töltött csoportok közötti elektrosztatikus kölcsönhatások alapján vagy a láncszerű parallel, vagy az

orientációs kényszer a szomszédos molekulák PN vektorait is bizonyos mértékig egymással párhuzamos orientációba rendezi. Ugyanakkor a PN vektorok egymás melletti párhuzamos elrendeződését (és ezzel az azonos töltésű csoportok egymáshoz viszonylag közel kerülését) elősegíti a TA ionoknak a hidrofób hidratációjukból eredő hajlama kontakt párok létrehozására. A TA és DP ionos csoportok egymástól markánsan eltérő hidratációja tehát a fejcsoportok olyan elrendeződésének kialakulását segíti elő, amelyet egyébként a membrán kettősréteg geometriája az ikerionos csoportok töltései közt ható elektrosztatikus kölcsönhatások ellenében amúgy is kikényszerít. Ez a tény magyarázhatja a foszfatidilkolin fejcsoportot tartalmazó lipid molekulák membránjainak kiemelkedő stabilitását, és így az ilyen típusú lipidek dominanciáját az élő sejtek membránjában is.

III.4.4. Koleszterin hatása a DMPC membrán szerkezetére

A koleszterin és származékai az eukarióta sejt membránjának szintén fontos alkotórészei. Membránbeli koncentrációjuk egyes esetekben elérheti akár az 50 mol%-ot is [267]. A foszfolipid molekulák mellett így a koleszterinszármazékok is az élő sejtmembrán alapvető komponensének tekinthetők. Ezért a tiszta foszfolipid membránok mellett a különböző koncentrációjú foszfolipid-koleszterin elegy membránok molekuláris szerkezetének részletes vizsgálata is fontos lépésnek tűnik a biológiai membránok szerkezetének és működésének megértése felé.

A foszfolipid molekulák koleszterinnel nem elegyednek korlátlanul, szételegyedési tartományuk egybeesik az élő sejtek membránjára jellemző hőmérséklet-, nyomás- és koncentrációtartománnyal [267-274]. Például 37 °C-on és 1 atm nyomáson a dimirisztoil-foszfatidilkolin (DMPC) nem elegyíthető koleszterinnel 10 és 28 mol% közötti koleszterin koncentráció esetén [267]. Ezért az élő sejtek membránjában sokszor fázisszétválás történik, melynek során koleszterinben szegény és koleszterinben gazdag tartományok jönnek létre [267-270]. Kísérleti adatok sora bizonyítja, hogy a folyadékkristályos fázisú foszfolipid membránok tulajdonságai megváltoznak koleszterin jelenlétében [275]. Így például koleszterin hozzáadásának hatására csökken az ilyen membránok permeabilitása [276-280], a membrán rugalmasabbá válik [281], felületi moláris sűrűsége megnő [282], miközben a foszfolipid molekulák rendezettebbé válnak [283,284]. Általában koleszterin jelenlétében csökken a különbség a membrán folyadékkristályos és gél- α fázisú szerkezete között.

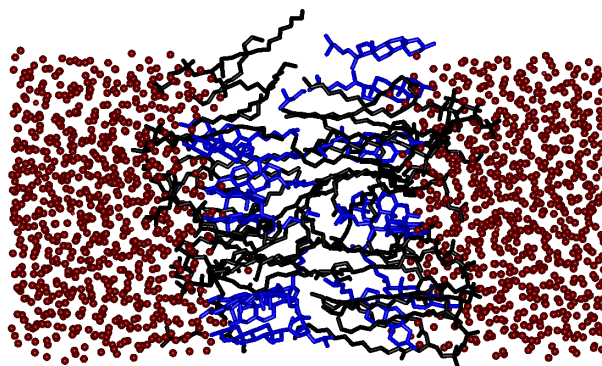
Az utóbbi évtizedben több számítógépes szimulációs vizsgálatot végeztek foszfolipid – koleszterin elegy membránokon is [261,285-291]. Ezeknek a szimulációknak a nagy részét azonban 50 és 60°C közötti hőmérsékleten végezték [261,285-289,291], általában olyan

koleszterin koncentráció mellett, amely – legalábbis 37 °C-on, testhőmérsékleten – a DMPC-koleszterin szételegyedési tartományba esik [285,286,288-291]. Csak néhány szimulációt végeztek a biológiailag releváns összetétel tartományok valamelyikében, általában 50 mol%-os koleszterin koncentráció mellett [261,287,289,291]. Tudomásunk szerint eddig mindössze egyetlen vizsgálatot végeztek koleszterinben szegény összetételnél: az egyik első ilyen vizsgálat során Edholm és Nyberg 3 mol% koleszterint tartalmazó elegy szimulációját végezte el [285].

Kutatásaink során különböző összetételű, teljesen hidratált DMPC-koleszterin elegy membránokat vizsgáltunk Monte Carlo szimuláció segítségével. A rendszerek összetételét úgy választottuk meg, hogy azok a szételegyedési tartomány mindkét oldalát reprezentálják. Vizsgálatainkat kiterjesztettük a tiszta DMPC membrán előzőekben részletesen tárgyalt szimulációval kapott modelljére, mint referenciarendszerre is. A szimulációk alapján a membrán különböző szerkezeti jellemzőinek a koleszterin koncentrációjától való függését vizsgáltuk. A membrán egészének szerkezetét jellemző fontos tulajdonságok mellett megvizsgáltuk, hogyan módosul az egyes DMPC molekulák szerkezete koleszterin közelében. A membrán lokális szerkezetének ilyen változásai szintén nagy jelentőségűek lehetnek, hiszen – egyebek között – megváltoztathatják a membrán szolvatáló- ill. áteresztőképességét is. Munkánkat kiterjesztettük kis molekulák oldódási szabadenergia-profiljának, valamint a membránban található üregeknek a részletes vizsgálatára is. A továbbiakban ezeket az eredményeket foglalom össze.

A szimulációkat a tiszta DMPC membránéhoz hasonló módon végeztük izoterm-izobár (N,p,T) sokaságon 1 atm nyomáson és 37 °C hőmérsékleten. Négy különböző összetételű rendszert vizsgáltunk. Az I rendszer az előzőekben részletesen tárgyalt tiszta DMPC-ből álló kettős réteg volt. Ezt a rendszert referenciarendszernek tekintettük, amihez a többi rendszer tulajdonságait hasonlítani tudjuk. A II és III rendszer 4 illetve 8 mol% koleszterint tartalmazott. Ezen rendszerek összetételét a

DMPC és koleszterin szételegyedési tartományának koleszterinben szegény oldaláról választottuk. Végezetül a 40 mol% koleszterint tartalmazó IV rendszer a szételegyedési tartomány koleszterinben gazdag oldalát reprezentálta. A koleszterint tartalmazó rendszerek szimulációjának kiindulási konfigurációit úgy állítottuk elő, hogy az I rendszer kiindulási konfigurációjában a

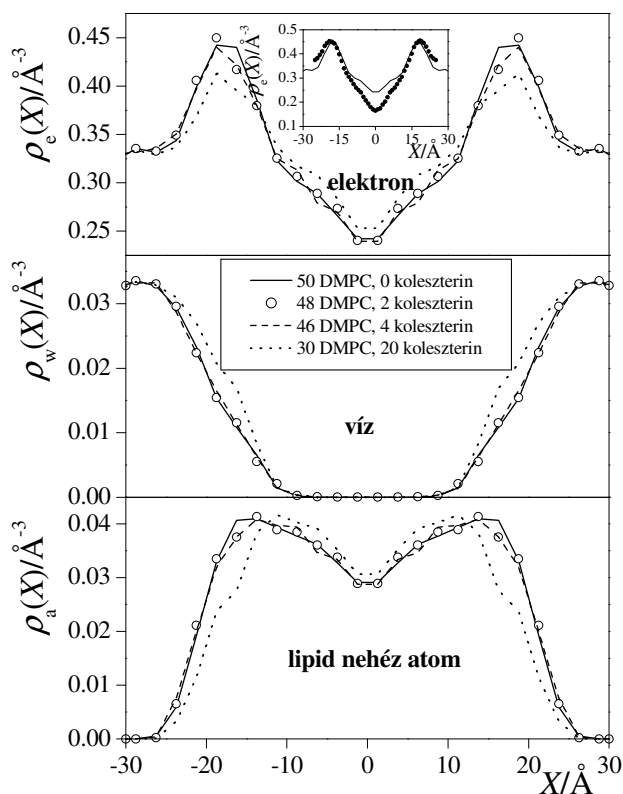


III.4.9. ábra A IV rendszer egy egyensúlyi konfigurációja. A DMPC, koleszterin és vízmolekulákat fekete, kék ill. piros szín jelzi. A jobb áttekinthetőség kedvéért a H atomokat nem tüntettük fel az ábrán.

kettős réteg mindkét oldalán 1, 2 illetve 10 véletlenszerűen kiválasztott DMPC molekulát koleszterinre cseréltünk. A IV rendszer egy egyensúlyi konfigurációját illusztrációként a III.4.9. ábra mutatja.

III.4.4.1. Átlagos szerkezet

A szimulációk során kapott eredményeink azt mutatták, hogy az egyes rendszerek keresztmetszete a koleszterin koncentrációjának növekedésével fokozatosan csökken: az egy molekulára eső átlagos membránfelület az I, II, III ill. IV rendszerben 58.2, 57.0, 56.7 ill. 53.2 Å²-nek adódott. Ezek az eredmények a kísérleti adatokkal összhangban [282,283] arra utalnak, hogy a membrán koleszterin hatására laterális összehúzódást szenved. A négy szimulált rendszer elektronsűrűség-profilja, valamint a vízmolekulák illetve a lipid (DMPC és koleszterin) molekulák nehéz atomjainak (C, N, O ill. P atomok) a membrán két oldalára átlagolt darabszámsűrűség-profilja a III.4.10. ábrán látható. Az ábra betétje a tiszta DMPC membránra kapott elektronsűrűség-profil kísérleti adatokkal [292] való összevetését mutatja. A kísérleti görbét a membrán közepén található sűrűség-minimum mélységének a kivételével jól sikerült reprodukálni. Azonban, mivel eredményeink szerint a membrán apoláros régiójában a sűrűség viszonylag kevésbé függ a membrán összetételétől, a kísérleti adatoktól való ezen eltérés a további vizsgálatok szempontjából nem tűnik jelentős problémának. Ésszerűnek látszik ugyanis feltételezni, hogy magukhoz a sűrűségekhez hasonlóan a számított sűrűségeknek a valódi membránra jellemző értékektől való eltérése is csak gyengén függ



III.4.10. ábra Elektronsűrűség-profil (felső panel), a víz molekuláris darabszámsűrűség-profilja (középső panel) valamint a DMPC és koleszterin molekulák nehéz (C, N, O és P) atomjainak darabszámsűrűség-profilja (alsó panel) a szimulált membránokban. Az ábra betétje a tiszta DMPC membrán számított elektronsűrűség-profiljának (folytonos vonal) röntgendiffrakciós kísérleti adatokkal (tele körök) [292] való összehasonlítását mutatja.

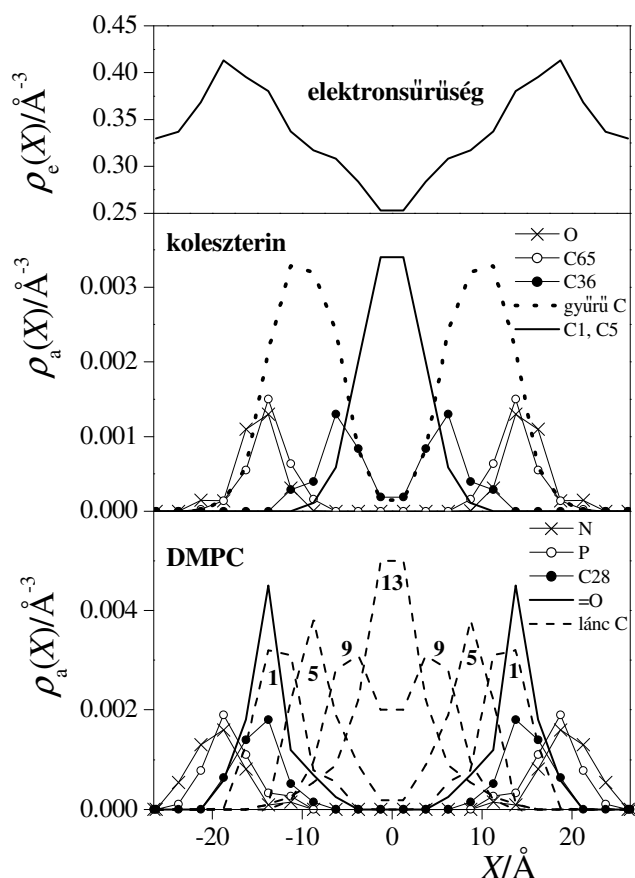
az összetételtől, és így nem játszik szerepet a tulajdonságok összetétellel való változásának vizsgálatában.

A különböző rendszerekben kapott sűrűségprofilok összehasonlítása azt mutatja, hogy a tiszta DMPC membránban kapott profilok kis mennyiségű koleszterin hozzáadásának hatására csak alig észrevehetően változnak. Hasonló megfigyelést tettek Tu és munkatársai [288] valamint Smondyrev és Berkowitz [289] 12.5 mol% illetve 11 mol% koleszterint tartalmazó dipalmitoilfoszfátidilkolin (DPPC)-koleszterin elegy membránok tiszta DPPC-vel való összehasonlítása során. A koleszterinben gazdag membrán (IV rendszer) átlagos szerkezete azonban több vonatkozásban is különbözik a tiszta DMPC-étől és a koleszterinben szegény elegy membránokétól. Jelentős mennyiségű koleszterin jelenlétében csökken a sűrűség a membránra merőleges X tengely mentén $\pm 14\text{\AA}$ és $\pm 25\text{\AA}$ között (az X tengely 0 pontjának a membrán közepét tekintjük), és megnő a sűrűség a membrán belsejében, $X = \pm 14\text{\AA}$ távolságon belül. Így a membrán legnagyobb és legkisebb sűrűségű részének sűrűségkülönbsége a tiszta DMPC membránban tapasztalt $0.20\text{\AA}^{-3}$ értékhez képest 20%-al, $0.16\text{\AA}^{-3}$ -ra csökken 40 mol% koleszterin jelenlétében. Más szóval, a koleszterinben gazdag membrán sűrűsége lényegesen kisebb változást mutat az X tengely mentén, mint a koleszterinben szegény, vagy azt egyáltalán nem tartalmazó membránok.

A víz és a lipid nehéz atom profilok összehasonlítása azt mutatja, hogy a koleszterinben gazdag membránban mind a víz-, mind pedig a lipid molekulák közelebb tudnak kerülni a membrán közepéhez, és így a szénhidrogénláncok tartományában az atomoknak egy kompaktabb elrendeződése tud megvalósulni, mint a másik három rendszerben. Ezzel összhangban a IV rendszerben a vízmolekulák sűrűsége 13 és 23 $\text{\AA}$ között észrevehetően nagyobb, mint a koleszterint nem, vagy csak kis mennyiségben tartalmazó membránokban, jelezve, hogy koleszterinben gazdag membránba jobban és mélyebben be tudnak hatolni a vízmolekulák, mint a nagy mennyiségű koleszterint nem tartalmazó membránokba.

A koleszterin átlagos membránszerkezetre gyakorolt hatásának jobb megértése érdekében kiszámítottuk különböző konstitúciós helyzetű atomoknak a térbeli eloszlását a membránra merőleges X tengely mentén a koleszterinben gazdag rendszerben. A kapott, és a membrán két oldalára átlagolt profilokat a III.4.11. ábra mutatja. A rendszer elektronsűrűség-profiljának (melyet referenciaként szintén feltüntettük az ábrán) a csúcsa nagyjából 15 és 25 $\text{\AA}$ közé esik. Ez az a tartomány, ahol a DMPC molekulák N és P atomjai elhelyezkednek, és ahol nagy mennyiségű koleszterin jelenlétében a sűrűség a leginkább csökken. Ez azt jelenti, hogy a membránban jelen lévő nagy mennyiségű koleszterin a DMPC fejcsoportjainak tartományában csökkenti a rendszer sűrűségét. Eredményeink azt mutatják, hogy a koleszterin O atomjainak sűrűsége lényegében 0-ra csökken a membrán közepétől 20 $\text{\AA}$ -re, azaz a koleszterin molekulák a fejcsoportok tartományának

csak nagyjából a közepéig érnek el, a DMPC fejcsoporthoz tartozó fejszomsorok tartományának egy jelentős része a koleszterinek számára lényegében nem megközelíthető. Ennek oka abban keresendő, hogy a koleszterin molekulák poláros feje mindössze egyetlen OH csoportból áll, azaz lényegesen kisebb a DMPC molekulák nagy, ikerionos foszfatidilkolin fejszomsorjánál. A különböző sűrűségprofilok



III.4.11. ábra Különböző konstitúciós helyzetű atomok eloszlása a membránra merőleges tengely mentén a IV rendszerben. Felső panel: a rendszer elektromsűrűség-profilja, középső panel: koleszterin atomok sűrűségprofilja, alsó panel: DMPC atomok sűrűségprofilja. Az 1, 5, 9 ill. 13 felirat a láncbéli első (C33 és C42), ötödik (C54 és C91), kilencedik (C66 és C103), illetve tizenharmadik (C78 és C115) szénatomokra utal.

összevetéséből az is látszik, hogy a koleszterin molekulákról hiányzó nagy poláros csoportok helyét részben víz tölti ki. Az X tengely mentén 13 és 23 Å között található tartomány, ahol a víz sűrűsége nagyobb a koleszterinben gazdag membránban, mint a másik háromban, nagyjából egybeesik azzal a réteggel, ahol a DMPC P atomok találhatóak, és közvetlenül a koleszterin molekulák legkülső (oxigén) atomjainak $X = 14$ Å-nél lévő legvalószerűbb pozíciója mellett helyezkedik el.

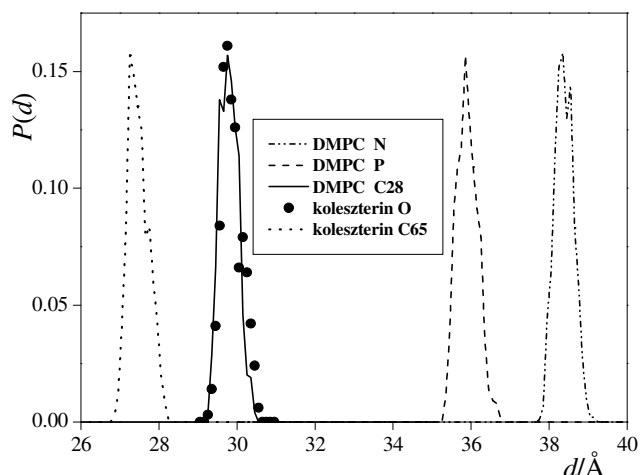
Az a tény, hogy jelentős mennyiségű koleszterin jelenlétében a membrán belsejének sűrűsége megnő, viszonylag egyszerűen magyarázható, legalábbis részben, azzal a ténnyel, hogy a szénatomok a koleszterin gyűrűrendszerében szorosabban vannak elrendeződve, mint a DMPC szénhidrogénláncában. A koleszterin gyűrűrendszerét felfoghatjuk két "szénhidrogénláncnak" is (C67-C70-C47-C49-C52-C38-C30-C33 és C62-C72-C71-C54-C44-C41-C40-C36, lásd a III.4.1. ábra jelöléseit), melyek négy kovalens kötéssel (a C70-C71,

C52-C54, C38-C40 ill. C33-C36 atomok között) össze vannak egymással kötve. A láncok közötti keresztkötések ezen rendszere az atomok sokkal szorosabb pakolódását teszi lehetővé, mint ami a DMPC két valódi szénhidrogénláncában, ahol az atomok van der Waals sugaraik összegénél jobban gyakorlatilag nem tudják egymást megközelíteni, megvalósulhat.

A III.4.11. ábrán látható atomi sűrűségprofilok alapján a szénhidrogénláncok átlagos szerkezetére vonatkozó következtetéseket is levonhatunk. Így például látható, hogy a DMPC molekulák karbonil O atomjai nagyjából $X = 15\text{\AA}$ értéknél találhatók a legnagyobb valószínűséggel. A koleszterin C36-os illetve C65-ös atomját (azaz a gyűrűrendszer két végpontját) a membrán közepétől 6 illetve $14\text{\AA}$ távolságra találjuk meg a legnagyobb valószínűséggel, vagyis a koleszterin gyűrűrendszerének atomjai zömmel ebbe az X tartományba esnek. Mind a DMPC, mind a koleszterin láncvégi CH_3 csoportjai a membrán középpontjától $5\text{\AA}$ -nél nem nagyobb távolságra találhatók. Nincs látható különbség a láncvégi CH_3 csoportok eloszlásában aszerint, hogy DMPC vagy koleszterin molekulákhoz tartoznak-e. Mindezen megfigyelések összhangban vannak az eddigi következtetéseinkkel, és azt mutatják, hogy a kétféle molekula apoláros része nagyjából egyforma hosszú, és a két molekula körülbelül azonos valószínűséggel képes elérni a membrán közepéig. Ez a megfigyelés ellentétben áll a hosszabb foszfatidilkolin (PC) molekulákkal, pl. DPPC-t tartalmazó PC-koleszterin elegy membránok szimulációi során tapasztaltakkal. Az ilyen membránokban a PC molekulák láncai észrevehetően hosszabbak a koleszterin molekuláénál, és így a koleszterin molekulák nem érnek el a membrán közepéig. A DMPC és DPPC molekulák különbsége okozhatja a koleszterinben gazdag elegy membránjaik elektronsűrűségprofiljai között megfigyelt markáns különbséget is. Nevezetesen, Smondyrev és Berkowitz DPPC és koleszterin 1:1 mol arányú elegye által alkotott membrán szimulációja során [289] azt tapasztalta, hogy a rendszer elektronsűrűség-profilja a membrán közepétől nagyjából $4\text{\AA}$ távolságra hirtelen drasztikusan lecsökken, és ezen távolságon belül – azaz a koleszterinek által el nem érhető régióban – még a tiszta DPPC membrán sűrűségénél is kisebb lesz (lásd a 289. hivatkozás 8. ábráját).

A III.4.11. ábráról az is látható, hogy a koleszterin O atomjainak az eloszlása a membránra merőleges X tengely mentén rendkívül hasonló a DMPC glicerinvázának középső (a III.4.1. ábra jelölése szerinti 28-as számú) C atomjához. Ez a megfigyelés összhangban van a korábbi, különböző összetételű DMPC-koleszterin [290] ill. DPPC-koleszterin [288,289] elegy membránok szimulációja során tapasztaltakkal. A koleszterin O és DMPC C28 atomjainak térbeli eloszlása közötti hasonlóság még szembeötlőbb a III.4.12. ábrán, mely a koleszterinben gazdag membrán d vastagságának eloszlását mutatja. A membrán vastagságát itt egy alkalmasan választott atomnak az X tengely mentén számított két rétegbeli átlagos pozíciójának különbségeként definiáljuk. A membrán koleszterin O illetve DMPC C28 atomok szerinti vastagságának eloszlása egyaránt $30\text{\AA}$ körül található, és a két eloszlás gyakorlatilag teljesen átfedi egymást. A koleszterin O és DMPC C28 atomok X tengely menti eloszlása közötti hasonlóság oka a koleszterin és a szomszédos DMPC molekulák közötti komplex hidrogénkötéses szerkezetben rejlik. A koleszterin molekula

OH csoportja ugyanis hidrogénkötéses kölcsönhatásba léphet a DMPC karbonil ill. foszfát csoportjainak oxigénjeivel. Ez a kölcsönhatás lehet közvetlen hidrogénkötés, vagy egy vízmolekulán keresztül két hidrogénkötéssel összekapcsolódó hídszerű szerkezet is. (A lehetséges koleszterin-DMPC hidrogénkötéses kölcsönhatásokat jól illusztrálja a 290. hivatkozás 10. ábrája.) Ezért a koleszterin molekulák OH csoportjukon keresztül erősen kapcsolódnak a szomszédos DMPC molekulák poláros csoportjához [290]. Ez a meglehetősen összetett hidrogénkötéses szerkezet rögzíti a koleszterin poláros OH csoportját nagyjából annak az X értéknek megfelelő helyen, ahol a DMPC C28 atomok is elhelyezkednek (azaz a karbonil és foszfát oxigének között). A koleszterin molekulák fejcsoportjának lerögzítődése egy adott X tartományban segít megérteni a membrán vastagságának nagy mennyiségű koleszterin jelenlétében megfigyelt csökkenését is (lásd a III.4.10. ábrát). Mivel a koleszterin molekulának a gyűrűrendszert követően csak egyetlen szénhidrogénlánc van, a DMPC molekulák koleszterinre cserélése (azaz a koleszterin koncentrációjának növelése) során elvileg hely szabadul fel a membrán közepén. A koleszterin molekulákat azonban fejcsoportjaik rögzítése megakadályozza abban, hogy a membrán belseje felé elmozdulva kitöltsék ezt a teret. Ehelyett a membrán két rétege kerül közelebb egymáshoz, ami a vastagság megfigyelt csökkenéséhez vezet, és magyarázza a sűrűség e tartományban tapasztalt növekedését is.

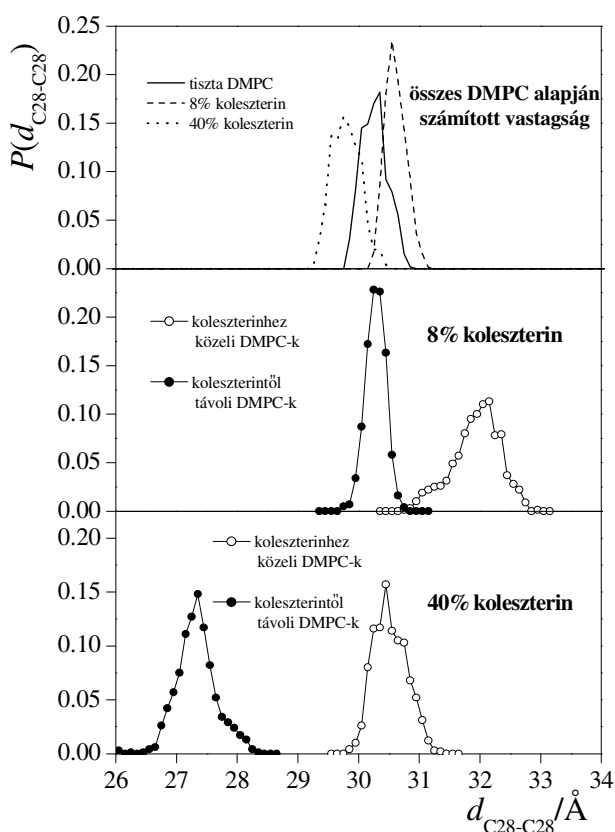


III.4.12. ábra A membrán (egy adott konstitúciós helyzetű atom két rétegbeli átlagos, membránra merőleges irányú pozíciójának távolságaként definiált) d vastagságának eloszlása a IV rendszerben öt különböző helyzetű atom alapján.

III.4.4.2. Közeli koleszterin molekula hatása a DMPC molekulák szerkezetére

A molekulák membránra merőleges irányú elrendeződése. Megvizsgáltuk a koleszterin koncentrációjának hatását a DMPC molekulák X tengely menti eloszlására is. Ennek érdekében összehasonlítottuk a 0, 8 illetve 40 mol% koleszterint tartalmazó membrán C28 atomok szerinti vastagságát (III.4.13. ábra). Az összehasonlítás meglepő eredményre vezetett, hiszen az átlagos vastagság 30.2 ± 0.2 , 30.6 ± 0.2 illetve 29.8 ± 0.2 Å-nek adódott az I, III ill. IV rendszer esetében. Vagyis kis mennyiségű koleszterin hozzáadásának hatására a membrán vastagabbá válik (azaz a C28 atomok a membrán közepétől távolabbra kerülnek), míg nagyobb mennyiségű koleszterin

jelenlétében ellenkező változás tapasztalható: a C28 atomok elhelyezkedése szerint a IV rendszer membránja vékonyabb a tiszta DMPC-nél. Ez utóbbi megfigyelés összhangban van az elektron-, víz illetve lipid nehézatom sűrűségprofilokkal (III.4.10. ábra), és egybevág a Tu és munkatársai által DPPC-koleszterin elegy membránra kapott eredményekkel [288] is. Megfigyeléseink nem változtak, ha a membránok C28 szerinti vastagsága helyett a P vagy az N atomok szerinti vastagságot hasonlítottuk össze, jelezvén, hogy a megfigyelt viselkedés szempontjából nincs különösebb jelentősége a vastagságot meghatározó atom kiválasztásának.



III.4.13. ábra A szimulált membránok DMPC C28 atomok szerinti vastagságának eloszlása. Felső panel: az I, III és IV rendszer összes DMPC molekula alapján számított vastagsága, középső panel: a koleszterinhez közeli és attól távoli DMPC molekulák szerinti vastagság a III rendszerben, alsó panel: a koleszterinhez közeli és attól távoli DMPC molekulák szerinti vastagság a IV rendszerben.

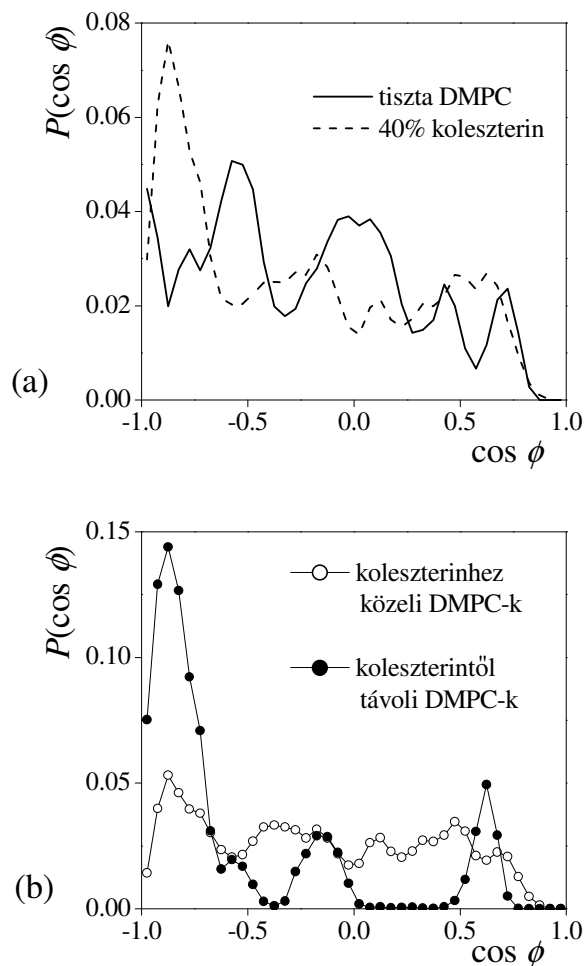
A membránvastagság fenti változásának értelmezéséhez két csoportra osztottuk a rendszerben lévő DMPC molekulákat aszerint, hogy van-e közvetlen koleszterin szomszédjuk, vagy nincs. Ennek érdekében az egyazon rétegben lévő DMPC és koleszterin molekulák tömegközéppontjait levetítettük az YZ síkra (azaz a membrán síkjára). A továbbiakban azokat a DMPC molekulákat, amelyek tömegközéppontjának vetülete 8 Å -nél közelebb van egy koleszterin tömegközéppontjának vetületéhez, "koleszterinhez közeli DMPC"-nek, a többi DMPC molekulát pedig "koleszterintől távoli DMPC"-nek nevezzük. A kritikus távolság értékének 8 Å -ös választását az indokolja, hogy a koleszterin tömegközéppont vetületeknek 8 Å távolságon belül átlagosan éppen két DMPC tömegközéppont vetület szomszédja van, és így a "koleszterinhez közeli DMPC" molekulák nagyjából egybeesnek a koleszterinnel valamilyen hidrogénkötéses kölcsönhatásban lévő DMPC molekulákkal. A fenti definíció szerint a II, III ill. IV rendszerben

átlagosan 4, 9 ill. 23 koleszterinhez közeli, és 44, 37 ill. 7 koleszterintől távoli DMPC molekula található.

A koleszterinhez közeli ill. azoktól távoli DMPC molekulák két rétegének C28 atomok szerinti távolságát külön-külön is mutatja a III.4.13. ábra a III és a IV rendszerben. Mint látható, 8 mol% koleszterin koncentráció mellett a membrán koleszterinektől távoli DMPC molekulák szerinti vastagságának eloszlása nagyon hasonló a tiszta DMPC-ben kapott eloszláshoz, azaz a vastagság kis mennyiségű koleszterin hatására bekövetkező növekedése kizárólag a koleszterinhez közeli DMPC molekuláknak tulajdonítható. Amint azt már korábban tárgyaltuk, koleszterin jelenlétében a koleszterin nagy fejcsoportjának hiánya miatt hely szabadul fel a fejcsoportok tartományában. Jelentős mennyiségű koleszterin esetén ez a hatás a lokális sűrűség észrevehető csökkenéséhez, valamint a vízmolekulák fokozottabb behatolásához vezet. Azt is tárgyaltuk korábban, hogy a koleszterin molekulák hidrogénkötéses kölcsönhatásokkal erősen kapcsolódnak a szomszédos DMPC molekulákhoz, és ezért egy-egy koleszterin molekula egymagában nem tud közelebb kerülni a vizes fázishoz, hogy ily módon töltse be a felszabadult teret. Azonban ez a tér, legalábbis részben betölthető oly módon, ha a koleszterin és DMPC szomszédai által alkotott hidrogénkötéses molekulakomplexek egésze mozdul el a vizes fázis felé. Ez az effektus vezethet a membrán két rétegében található koleszterinhez közeli DMPC molekulák C28 atomjainak a két réteg közötti nagy átlagos távolságához a III rendszerben. A koleszterinek és közeli DMPC szomszédai X tengely menti eloszlásának ilyen korrelációjára utal az a tény is, hogy a III rendszernek a koleszterinhez közeli DMPC-k C28 atomjai szerinti vastagsága $31.9 \pm 0.4 \text{ \AA}$ -nek adódott, ami kitűnően egyezik a koleszterin O atomok szerinti vastagság $31.8 \pm 0.2 \text{ \AA}$ értékével.

A koleszterinben gazdag membrán koleszterinhez közeli és attól távoli DMPC molekuláinak a két réteg közötti átlagos, C28 atomok szerinti távolságát összehasonlítva (lásd a III.4.13. ábra alsó paneljét) a III rendszerben látotthoz hasonló különbség figyelhető meg. A koleszterinhez közeli DMPC-k által adott eloszlás a koleszterintől távoli DMPC-kéhez képest nagyobb távolságok felé van eltolódva. Ezen eloszlások várható értéke és standard deviációja $30.5 \pm 0.3 \text{ \AA}$ ill. $27.4 \pm 0.4 \text{ \AA}$ értéknek adódott. Ez az eredmény is arra mutat, hogy – a III rendszerhez hasonlóan – a koleszterinhez közeli DMPC molekulák a IV rendszerben is átlagosan távolabb helyezkednek el a membrán közepétől, mint a koleszterintől távoli DMPC-k. Azonban a III rendszerben kapott megfelelő eloszláshoz képest a IV rendszerben mindkét eloszlás kisebb távolságértékek felé tolódott el. Ennek oka a membrán korábban tárgyalt vékonyodása a koleszterinben gazdag elegy esetén. Ez a vékonyodás elég jelentős ahhoz, hogy az összes DMPC molekula rétegek közötti átlagos C28 szerinti távolságát a tiszta DMPC-ben kapott értékeknél is kisebbre húzza össze. Ily módon jelentős mennyiségű koleszterin jelenléte a membránban éppen ellenkező hatással van a membrán vastagságára, mint ha a membrán csak kis mennyiségű koleszterint tartalmaz.

Molekulákhoz kötött vektorok membránhoz viszonyított orientációja. A koleszterin molekulák és velük szomszédos DMPC-k korrelált elrendeződése a membránra merőleges X tengely mentén a DMPC molekulák fejcsoportjának szerkezetére is hatással van. Ezt megvizsgálva kiszámítottuk az egyes DMPC molekulák PN vektora és a membránra merőleges, membrán belseje felé mutató $\underline{X}$ vektor által bezárt ϕ szög koszinuszának eloszlását az egyes rendszerekben. A tiszta DMPC membránban és a koleszterinben gazdag rendszerben kapott



III.4.14. ábra A DMPC molekula PN vektora és a membránra merőleges, a membrán közepe felé mutató $\underline{X}$ vektor által bezárt ϕ szög koszinuszának eloszlása. (a) Eloszlás az I és IV rendszerben. (b) A koleszterinhez közeli és attól távoli DMPC molekulák PN vektorai szerinti eloszlás a IV rendszerben.

eloszlása alatt marad. Ezek az eredmények jól magyarázhatók a koleszterin molekulák és DMPC szomszédai X tengely menti, előző alfejezetben tárgyalt, korrelált eloszlásával. Eszerint a

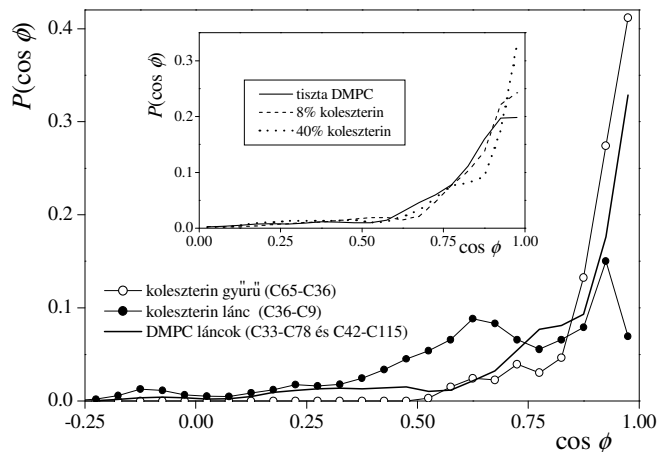
$P(\cos \phi)$ eloszlások összehasonlítását a III.4.14. ábra mutatja. Amint látható, a PN vektor lényegesen nagyobb valószínűséggel mutat mind a membránra merőlegesen a vizes fázis irányába, mind pedig visszafelé, a membrán belseje felé, ugyanakkor kisebb valószínűséggel mutat a laterális közeli irányokba a IV rendszerben, mint tiszta DMPC membránban. E jelenség megértése érdekében kiszámítottuk a koleszterinhez közeli és attól távoli DMPC molekulák járulékát a IV rendszerben kapott $P(\cos \phi)$ eloszláshoz. A kétféle helyzetű DMPC molekula $P(\cos \phi)$ járulékát a III.4.14. ábra alsó panelje mutatja. A koleszterinhez közeli DMPC molekulák $P(\cos \phi)$ eloszlása nagyjából egyenletes a $\cos \phi$ tartomány nagy részén, kb. 0.75-ig. Ez az eloszlás meglehetősen hasonló a tiszta DMPC membránban kapotthoz. Ugyanakkor a koleszterintől távoli DMPC molekulák által adott eloszlás egy nagy csúcsot mutat a $\cos \phi = -1$ érték közelében, és egy másik éles csúcsot 0.5 és 0.75 között, miközben a két csúcs közötti tartomány nagy részében az eloszlás gyakorlatilag 0 értéket vesz fel, és végig a koleszterinhez közeli DMPC-k

koleszterintől távoli DMPC molekulák átlagosan közelebb helyezkednek el a membrán közepéhez, mint koleszterinhez közeli társaik. A koleszterinben gazdag membránban, ahol a molekuláknak csak csekély hányada koleszterintől távoli DMPC, ezek a molekulák a koleszterinek és DMPC szomszédaik által alkotott hidrogénkötéses molekulakomplexekkel vannak körülvéve. E komplexek molekulái közelebb tudnak kerülni a vizes fázishoz, mint a közöttük lévő, koleszterintől távoli DMPC. Ez az elrendeződés jelentősen megnehezíti a központi, koleszterintől távoli DMPC molekula fejcsoportjának oldalirányú kiterjeszkedését, hiszen a rendelkezésére álló szabad térrész legvalószínűbb alakja egy, a membrán síkjára merőleges csatorna. Ezért az ilyen molekulák zömének PN vektora a membrán síkjára közel merőlegesen mutat a vizes fázis felé, azon PN vektorok pedig, melyek a szénhidrogén fázis felé állnak, a lehető legmeredekebben mutatnak a membrán belseje felé.

A III.4.15. ábra a koleszterin gyűrűrendszer, koleszterin lánc illetve DMPC láncok membránra merőleges tengellyel bezárt szögének koszinusz eloszlását mutatja a IV rendszerben. E szögek alatt az $\underline{X}$ vektornak a koleszterin C65 atomjából C36 atomjába, a koleszterin C36 atomjából C9 atomjába, illetve a DMPC C33 atomjából C78 atomjába vagy C42 atomjából C115 atomjába mutató vektorral bezárt szögét értjük. A koleszterin gyűrűrendszere és a DMPC láncok egyaránt erősen preferálják a membrán normálisával párhuzamos beállást. Természetesen ez a preferencia

erősebb a merev koleszterin gyűrűrendszer esetén, amely ettől a preferált beállástól nem is tud jelentősen eltérni. Meg kell jegyezni, hogy Chiu és munkatársai állításával [291] ellentétben e szög legvalószínűbb értéke (ami nem azonos az átlagos értékével) mind a koleszterin gyűrűrendszer, mind pedig a DMPC láncok esetében 0° .

A koleszterin láncok $\underline{X}$ vektorral bezárt szögének koszinusz eloszlása a másik kettőnél lényegesen kevésbé éles, 0.6 és 1 között (ez a koszinusz tartomány a kb. 0° és 50° közötti szögtartománynak felel meg) nagyjából állandó érték körül fluktuál. Ez a különbség a DMPC láncok és koleszterin gyűrűk illetve a koleszterin láncok orientációja között világosan mutatja,



III.4.15. ábra A koleszterin gyűrűrendszer, koleszterin lánc, valamint a DMPC láncok és a membránra merőleges, a membrán közepe felé mutató $\underline{X}$ vektor által bezárt szög koszinuszának eloszlása a IV rendszerben. Az ábra betétje a DMPC láncok által az I, III és IV rendszerben adott eloszlások összehasonlítását mutatja.

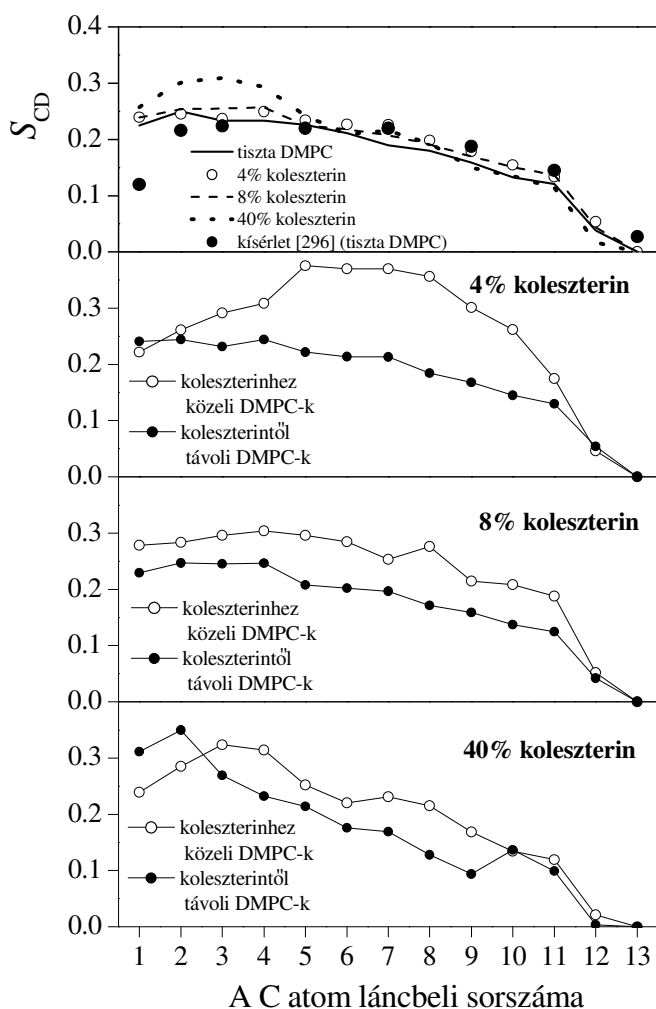
hogy a szénhidrogén fázis szerkezete más a membrán közepén, mint a koleszterin gyűrűk tartományában. A membrán középső része lényegesen izotrópabb, mint a szénhidrogén fázis külső részei. Ésszerűnek látszik az a feltételezés is, hogy a membrán közepének izotrópiája nagyobb a több koleszterint tartalmazó rendszerekben, hiszen a koleszterin molekula második láncának hiánya megkönnyíti a láncok oldalirányú kiterjeszkedését. (Ezt a kérdést a következőkben részletesebben is megvizsgáljuk.) Másfelől a szénhidrogén fázis külső része rendezettebb a membrán közepénél, és ez a rendezettség a koleszterin koncentrációjának – azaz a merev koleszterin gyűrűk számának – növekedésével tovább nő. Ezt illusztrálja a III.4.15. ábra betétje, amely a DMPC láncok $\underline{X}$ vektorral bezárt szögének koszinusz eloszlását mutatja az I, III és IV rendszerben. Amint látható, az eloszlás a koleszterin koncentrációjának növekedésével egyre meredekebbé válik. Ez a szénhidrogén fázis külső és belső részének szerkezete között megfigyelt különbség, ami egybevág a Marrink és munkatársai által tiszta DPPC membránon végzett szabad térfogat analízis [293] eredményeivel is, jelentős hatással lehet a membrán áteresztőképességére [293-295].

A DMPC láncok szerkezete. A DMPC láncok lokális rendezettségét a membrán különböző mélységű rétegeiben a láncok deutérium rendparaméterének profiljával jellemezhetjük. Ezt a profilt kísérletileg, szelektíven deuterált minta NMR spektroszkópai vizsgálatával is meg lehet határozni. Egy adott konstitúciós helyzetű C atom S_{CD} deutérium rendparaméterét a szimuláció során az

$$S_{CD} = \left\langle \frac{3}{2} \cos^2 \alpha - \frac{1}{2} \right\rangle \quad (\text{III.4.5})$$

egyenlet alapján lehet kiszámítani, ahol α a C-D kötés és a membránra merőleges X tengely szöge, a $\langle \dots \rangle$ zárójel pedig sokaságátlagolást jelent. A DMPC molekulák két láncra átlagolt számított S_{CD} profilját a négy szimulált rendszerben a III.4.16. ábra mutatja. Az ábrán összehasonlítóképpen feltüntettük a tiszta DMPC membránban kísérletileg kapott profilt [296] is. (Meg kell jegyezni, hogy a rendparaméter-profil számításakor a szénatomokat a DMPC molekula közepétől a láncok vége felé haladva számoztuk, azaz a C33 és C42 atomokat tekintettük az első, míg a láncvégi C78 és C115 atomokat az utolsó (tizenharmadik) láncbéli szénatomoknak.)

A tiszta DMPC membrán kísérleti S_{CD} profilját az első szénatomokat kivéve a lánc teljes hosszában sikerült jól reprodukálni a szimuláció során. A különböző összetételű rendszerekben kapott profilok összehasonlítása csak viszonylag kis különbségeket mutat: a növekvő koleszterin koncentrációval az első öt CH_2 csoport rendparamétere kismértékben növekedett. Amint a III.4.11. ábráról látható, ezek a CH_2 csoportok a koleszterinmolekulák gyűrűrendszereivel nagyjából azonos



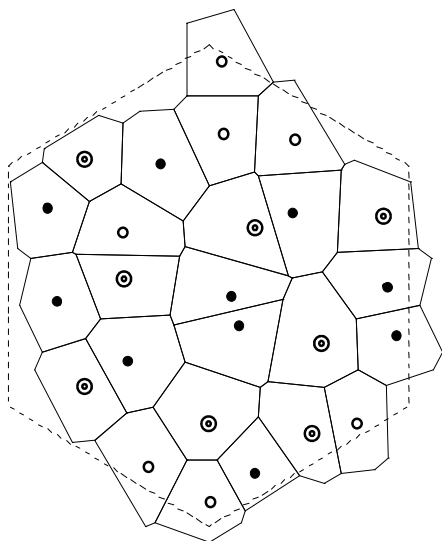
III.4.16. ábra A deutérium rendparaméter profilja a DMPC láncok mentén az egyes rendszerekben. Felső panel: a különböző rendszerekben az összes DMPC molekula alapján kapott profilok összehasonlítása. A tiszta DMPC membránban kísérletileg kapott profilt [296] tele körök jelzik. A koleszterinhez közeli és attól távoli DMPC molekulák alapján kapott profil összehasonlítását a II, III ill. IV elegy membránban az ábra második, harmadik ill. legalsó panelje mutatja.

mélységben található a membránra merőleges X tengely mentén. A membrán közepe felé haladva a rendparaméter értéke drasztikusan csökken mind a négy rendszerben, mutatván, hogy a szénhidrogén fázis a membrán közepe felé egyre izotrópabbá válik.

A III.4.16. ábrán a koleszterinhez közeli ill. attól távoli DMPC molekulák S_{CD} profilját is feltüntettük. Ez az összehasonlítás egyértelműen mutatja, hogy a DMPC láncok rendezettsége jelentősen megnő koleszterin közelében. Ez a hatás azonban a koleszterin koncentrációjának növekedésével egyre gyengébbé válik, a két profil közötti különbség a II rendszertől a IV rendszer felé haladva fokozatosan csökken. A koleszterin molekula tehát rendezettebbé teszi a szomszédos DMPC-k szénhidrogénláncait, de ez a rendező hatás a koleszterin növekvő koncentrációjával fokozatosan gyengül, ami megmagyarázza a DMPC láncok átlagos rendezettségének a megfigyelt gyenge függését a koleszterin koncentrációjától.

III.4.4.3. A membrán lokális laterális szerkezete

A különböző összetételű membránok molekulái körüli lokális laterális szerkezet vizsgálata során az egyes DMPC és koleszterin molekulák tömegközéppontját levetítettük a membrán YZ síkjára, és e vetített pontokon két dimenziós Voronoi analízist végeztünk. E számítás során a membrán két rétegét egymástól független mintaként kezeltük. Hasonló módon vizsgálta a molekulák laterális

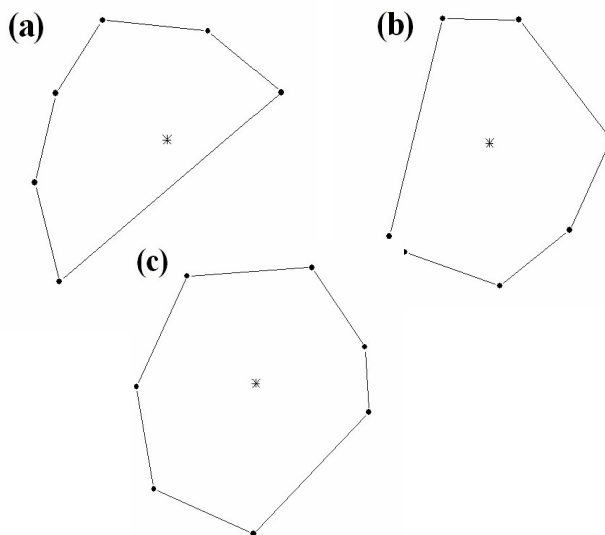


III.4.17. ábra A koleszterin (tele körök), hozzájuk közeli DMPC (kettős körök) ill. tőlük távoli DMPC molekulák (üres körök) vetületeinek Voronoi cellái a IV rendszer egy egyensúlyi konfigurációjában.

elrendeződését tiszta DMPC membránban Shinoda és Okazaki [297]. (A vizsgálatokat megismételtük úgy is, hogy a molekulák tömegközéppontja helyett a DMPC C28 és koleszterin O atomokat vetítettük a membrán síkjára, a kétféle módon kapott eredmények azonban érdemben nem különböztek egymástól.) A vetített pontok egy adott konfigurációját a IV rendszerben a hozzájuk tartozó Voronoi cellákkal a III.4.17. ábra, a koleszterinek valamint a hozzájuk közeli illetve tőlük távoli DMPC-k egy-egy tipikus Voronoi celláját pedig a III.4.18. ábra szemlélteti. Az egyes Voronoi cellák méretét a területükkel (A), alakját pedig a ϕ acirkularitási paraméterrel illetve a csúcsok N_v számával jellemeztük. Az acirkularitási paramétert a

$$\phi = \frac{1}{4\pi} \frac{L^2}{A} \quad (\text{III.4.6})$$

egyenlettel definiáltuk, ahol L a Voronoi cella kerülete. A fenti definíció értelmében ϕ értéke szabályos kör esetén pontosan 1, és minél elnyújtottabb (kevésbé körszerű) egy síkidom, annál nagyobb a hozzá tartozó ϕ érték. Az A , L , ϕ és N_v paraméterek átlagos értékét az I, III és IV rendszerben a III.4.3. táblázat foglalja össze. Az összes molekulára jellemző átlagos értékek mellett a táblázatban feltüntettük a koleszterinre valamint a hozzájuk közel illetve tőlük távol eső DMPC molekulákra külön-külön kapott értékeket is. A Voronoi cellák területének és acirkularitási paraméterének az eloszlását a IV rendszerben a III.4.19. ábra mutatja külön-külön e három fajta molekulára. Látható, hogy a koleszterin-től távoli DMPC molekulák Voronoi cellájának területeloszlása nagyobb A értékek körül található,



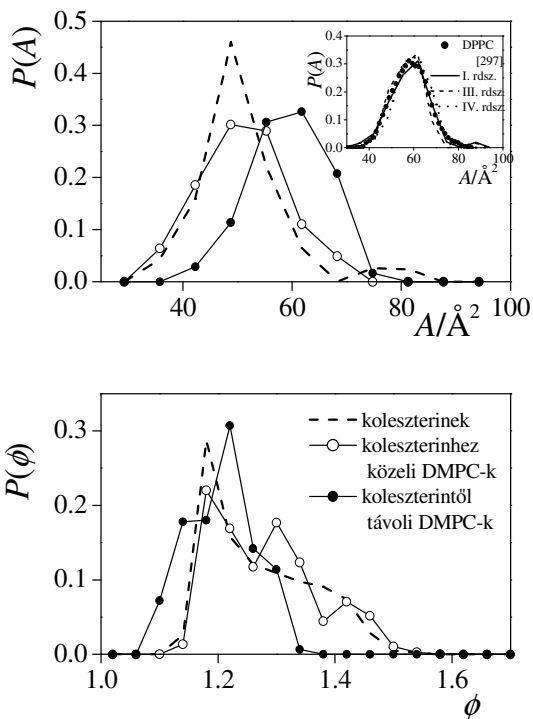
III.4.18. ábra A koleszterin (a), a hozzá közeli (b) ill. tőle távoli DMPC molekula (c) egy-egy tipikus Voronoi cellája.

mint a koleszterineké vagy a hozzájuk közel eső DMPC molekuláké, ugyanakkor e két utóbbi fajta molekula $P(A)$ görbéje egymással nagyjából megegyezik. Az ábra betétjéből látható az is, hogy a koleszterintől távoli DMPC molekulák $P(A)$ eloszlása gyakorlatilag azonos a különböző összetételű membránokban. Ez az eloszlás ráadásul igen hasonló a Shinoda és Okazaki által más potenciálmodellel szimulált tiszta DPPC membránban kapott $P(A)$ görbékhez [297] is. A Voronoi cellák területének átlagos értékei (III.4.3. táblázat) a többi rendszerben is hasonló képet mutatnak.

III.4.3. táblázat A különböző molekulák Voronoi celláit jellemző paraméterek átlagos értéke ill. standard deviációja a vizsgált rendszerekben.

		40% koleszterin	8% koleszterin	tiszta DMPC
$\langle A \rangle / \text{\AA}^2$	összes molekula	53.2 ± 8.6	56.7 ± 8.8	58.3 ± 8.7
	koleszterin	50.9 ± 8.5	52.3 ± 11.9	-
	koleszterinhez közeli DMPC	50.9 ± 7.5	52.6 ± 11.1	-
	koleszterintől távoli DMPC	59.1 ± 6.8	57.4 ± 7.9	58.3 ± 8.7
$\langle L \rangle / \text{\AA}$	összes molekula	28.8 ± 1.9	29.7 ± 1.7	30.0 ± 1.5
	koleszterin	28.3 ± 1.9	28.6 ± 2.2	-
	koleszterinhez közeli DMPC	28.5 ± 2.0	28.8 ± 2.4	-
	koleszterintől távoli DMPC	29.9 ± 1.3	29.9 ± 1.4	30.0 ± 1.5
$\langle \phi \rangle$	összes molekula	1.256 ± 0.086	1.250 ± 0.088	1.245 ± 0.098
	koleszterin	1.269 ± 0.089	1.278 ± 0.139	-
	koleszterinhez közeli DMPC	1.281 ± 0.088	1.279 ± 0.057	-
	koleszterintől távoli DMPC	1.207 ± 0.055	1.245 ± 0.082	1.245 ± 0.098
$\langle N_v \rangle$	összes molekula	6.00 ± 0.99	6.00 ± 0.88	6.00 ± 0.83
	koleszterin	5.90 ± 0.95	5.87 ± 1.19	-
	koleszterinhez közeli DMPC	5.79 ± 0.83	5.77 ± 0.81	-
	koleszterintől távoli DMPC	6.38 ± 1.10	6.03 ± 0.85	6.00 ± 0.83

Az a tény, hogy a koleszterintől távoli DMPC molekulák Voronoi cellája átlagosan nagyobb (azaz a molekulák körüli lokális laterális sűrűség átlagosan kisebb), mint a másik két fajta molekula esetében, arra utal, hogy a koleszterin molekulák és legközelebbi DMPC szomszédai között valamilyen specifikus kölcsönhatás léphet föl, aminek következtében egymást átlagosan jobban meg tudják közelíteni, mint bármely más laterálisan szomszédos molekulapár. Ez a kölcsönhatás meglehetősen összetett. Egyes DMPC-koleszterin párok esetében nyilvánvalóan szerepet játszik benne a molekulák közötti közvetlen hidrogénkötéses kapcsolat is (két DMPC molekula H-donor csoport hiányában egymással ilyen kapcsolatot nem tud létesíteni). Eredményeink azonban azt mutatták, hogy a IV rendszerben a koleszterin molekulák mindössze 13%-a létesít közvetlen hidrogénkötést egy DMPC molekulával, és így az ilyen hidrogénkötések



III.4.19. ábra A koleszterinhez közeli (üres körök) és attól távoli DMPC molekulák (tele körök) valamint a koleszterinek (szaggatott vonal) körüli Voronoi cellák területének (felső ábra) és acirkularitási paraméterének (alsó ábra) eloszlása a IV rendszerben. Az ábra betétje a koleszterintől távoli DMPC-k Voronoi celláinak területeloszlását mutatja a különböző rendszerekben. Összehasonlításképpen a Shinoda és Okazaki által tiszta DPPC membránban kapott eloszlást [297] is feltüntettük (tele körök).

kölcsönhatásnak tudható be.

Az acirkularitási paraméternek a háromféle molekulára kapott eloszlását összehasonlítva láthatjuk, hogy a fentiekkel összhangban a koleszterinek illetve a hozzájuk közeli DMPC-k Voronoi cellái lényegesen elnyúltabbak lehetnek, mint a koleszterinektől távoli DMPC molekuláké. (Hasonlóképpen, egy koleszterinektől távoli DMPC Voronoi cellája átlagosan több csúccsal jellemezhető, mint a másik két fajta molekuláé.) Ennek oka az, hogy a molekulák lokális laterális környezetének a körszerű szimmetriáját a közeli koleszterin-DMPC párok közötti specifikus kölcsönhatás torzítja. A koleszterin molekulák $P(\phi)$ görbéje azonban nem szimmetrikus, az acirkularitási paraméter nagy értékei felé hosszan elnyúlik, 1.4 érték körül pedig egy vállat mutat. (A koleszterinhez közeli DMPC-k $P(\phi)$ görbéje is hasonló alakú, habár jóval zajosabb.)

csak részben magyarázzák a koleszterinek és legközelebbi DMPC szomszédai között tapasztalt szoros illeszkedést. A jelenség további magyarázata a koleszterinnek a hozzá közeli DMPC molekulák szénhidrogénláncait rendező, előző alfejezetben részletesen tárgyalt hatásában rejlik. A rendezettebb szénhidrogénláncok ugyanis laterális irányban nem tudnak annyira kiterjedni, mint a rendezetlenebb láncok, és így a DMPC molekula tömegközéppontja is közelebb marad a láncait rendező koleszterinhez. Más szóval, a hidrogénkötés a két molekula fejcsoportját, míg a koleszterin szénhidrogénláncokat rendező hatása a két molekula apoláros farokrészét tartja egymás közelében. Az a tény pedig, hogy a koleszterintől távoli DMPC molekulák $P(A)$ görbéje a rendszer összetételétől függetlennek bizonyult, arra utal, hogy a membrán koleszterin hatására tapasztalt, az összes molekula átlagos A értékében is megmutatkozó (III.4.3. táblázat), kísérletileg is megfigyelt [282,283] laterális összehúzódása kizárólag ennek a koleszterinek és legközelebbi DMPC szomszédai között fellépő specifikus

Ennek az elnyúlt alaknak az oka feltehetőleg abban rejlik, hogy egyes közeli DMPC-koleszterin párok között közvetlen hidrogénkötés is fellép, ami még közelebb hozza a két molekulát egymáshoz, mint pusztán a koleszterin DMPC láncokat rendező hatása. A koleszterin $P(\phi)$ görbéjének integrálása azt mutatja, hogy az eloszlásnak a csúcs nagy ϕ értékek felőli oldalán található vállig terjedő részét a molekulák 85%-a, a vállon túli részt pedig a többi 15% adja. Ez az adat jól egyezik a DMPC-vel hidrogénkötést létesítő koleszterinek 13%-os arányával, és megerősíti azt a feltevésünket, hogy a $P(\phi)$ eloszlás elnyúlt alakja és a nagy ϕ értékeknél megjelenő váll a szomszédos DMPC molekulával hidrogénkötést létesítő koleszterineknek tudható be.

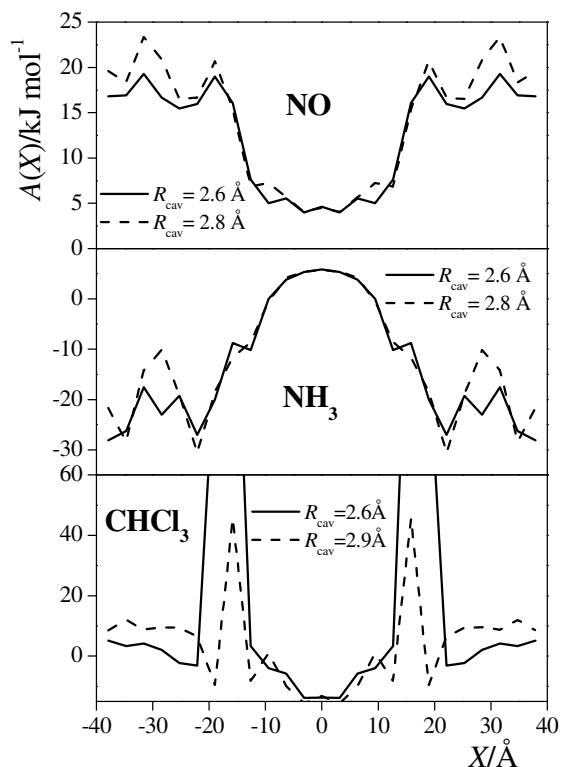
III.4.5. Kis molekulák oldódási szabadenergia-profilja a membránban

Munkánk során vizsgáltuk a membrán összetételének hatását különböző kis, semleges, élettani szempontból jelentős molekulák oldódási szabadenergiájának membránbeli profiljára is. Ennek érdekében kiszámítottuk a III.4.1.3 fejezetben tárgyalt nyolc, különböző méretű és polaritású molekula (O_2 , CO , CO_2 , NO , H_2O , NH_3 , $CHCl_3$, formamid) szabadenergia-profilját az előző fejezetben tárgyalt tiszta DMPC és három különböző összetételű DMPC-koleszterin elegy membránban. A számításokat a CIW módszer (III.4.1.3 fejezet) segítségével végeztük a négy rendszer szimulációja során elmentett 1000-1000 mintakonfiguráción. A profil számításához a rendszereket a membrán normálisa mentén 25 egyenlő vastag szeletre bontottuk, az oldódási szabadenergia értékét az egyes szeletekben külön-külön számítottuk. A beillesztésre alkalmas, adott R_{cav} értéknél nagyobb sugarú üregeket négy, egymáshoz képest eltolt rács pontjaiban kerestük. Mindegyik rács szeletenként 7500 pontot tartalmazott. A tesztreszecskeket pontonként 10 különböző, véletlenül választott orientációban is beillesztettük. A számításokat két R_{cav} értékkel, 2.6 ill. 2.8 Å-mel is elvégeztük. Ezen kívül, miután a legnagyobb molekulák esetén vélhetően csak a legnagyobb üregekbe való beillesztés adhat a III.4.2 egyenletben szereplő sokaságtlaghoz értékelhető járulékot, a három legnagyobb molekula, azaz a CO_2 , a kloroform és a formamid esetén a számításokat $R_{cav} = 2.9$ Å értékkel is megismételtük, tíz különböző rácsot használva a kereséshez.

A tiszta DMPC membránban NO és NH_3 molekulákra 2.6 Å és 2.8 Å kritikus üregsugárral, valamint a $CHCl_3$ molekulára 2.6 Å és 2.9 Å kritikus üregsugárral kapott profilok összehasonlítását a III.4.20. ábra mutatja. Az R_{cav} paraméter 2.6 Å ill. 2.8 Å értéke mellett kapott profilok minden esetben egymáshoz meglehetősen hasonlóknak bizonyultak, az $R_{cav} = 2.6$ Å

választás esetén kapott szabadenergia értékek általában néhány kJ/mol-lal alacsonyabbak voltak, mint az $R_{\text{cav}} = 2.8 \text{ \AA}$ esetben kaptak. Ez a különbség a nagyobb molekulák esetén kisebb volt. Mivel a számításokat mindkét esetben ugyanúgy végeztük el, a tapasztalt különbségek a 2.6 és 2.8 $\text{\AA}$ közötti sugarú üregeknek az utóbbi számítás során történő elhagyásából adódnak. Ezek az üregek, főképp a kisebb molekulák esetében, időnként alkalmasak lehetnek kellően alacsony energiájú beillesztésekre. Az $R_{\text{cav}} = 2.9 \text{ \AA}$ értékkel végzett számítások során a 2.6 és 2.9 $\text{\AA}$ közötti sugarú üregek elhagyása a számítást olymértékben meggyorsította, hogy így lehetőség nyílt több rácspont használatával a legnagyobb ($R_{\text{cav}} \geq 2.9 \text{ \AA}$) üregek részletesebb feltérképezésére. Az így kapott profilok a CO_2 és a formamid molekula esetén körülbelül megegyeztek az $R_{\text{cav}} = 2.8 \text{ \AA}$ értékkel kapott profilokkal, jelezve, hogy a 2.8 és 2.9 $\text{\AA}$ közötti sugarú üregek elhagyásával okozott hibát nagyjából kompenzálta a 2.9 $\text{\AA}$ fölötti sugarú üregek több rácsponton történő keresése. A CHCl_3 molekula esetén azonban az $R_{\text{cav}} = 2.9 \text{ \AA}$ esetén számított profil lényegesen alacsonyabb szabadenergia értékeket mutatott, mint a másik két üregsugárral kapott. Ez a különbség különösen a membrán nagy sűrűségű fejcsoporti régiójában bizonyult jelentősnek. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a nagy méretű CHCl_3 molekulánál a legnagyobb üregek minél alaposabb felkutatása lényegesen fontosabb a viszonylag kis, 2.6-2.9 $\text{\AA}$ sugarú üregek figyelembe vételénél, hiszen ekkora üregekbe a CHCl_3 molekula már általában nem illeszthető be kellően alacsony energiájú pozícióba. Mindezek alapján a további vizsgálatokhoz CHCl_3 esetén az $R_{\text{cav}} = 2.9 \text{ \AA}$, a másik hét molekulánál pedig az $R_{\text{cav}} = 2.6 \text{ \AA}$ értékkel kapott profilokat használtuk.

Az egyes molekuláknak az I, III és IV összetételű (0, 8 ill. 40 mol% koleszterint tartalmazó) membránban kapott, a membrán két oldalára átlagolt szabadenergia-profiljait a III.4.21.-III.4.23. ábrák mutatják. Látható, hogy a koleszterin jelenléte lényegében nem befolyásolja az oldódási szabadenergia értékét sem a vizes fázisban, sem pedig a membrán apoláros, belső részében. Ugyanakkor a membrán nagy sűrűségű fejcsoporti rétegében, nagyjából $10 \text{ \AA} < X < 20 \text{ \AA}$

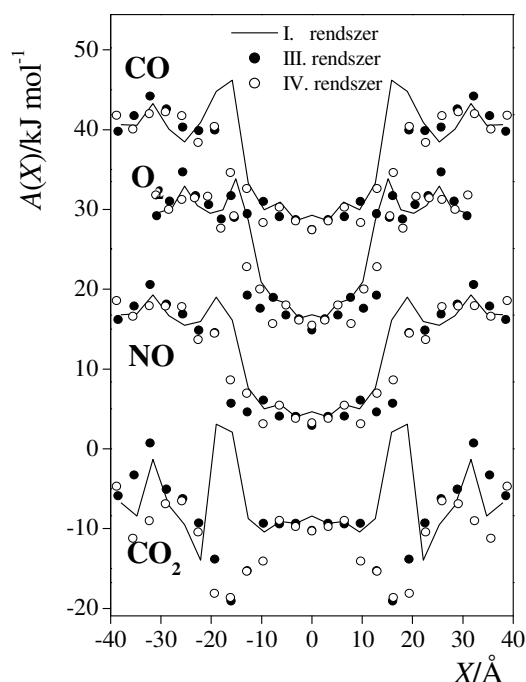


III.4.20. ábra Az NO (felső panel), NH_3 (középső panel) és CHCl_3 (alsó panel) molekula tiszta DMPC membránban különböző R_{cav} értékek mellett kapott szabadenergia-profiljainak összehasonlítása.

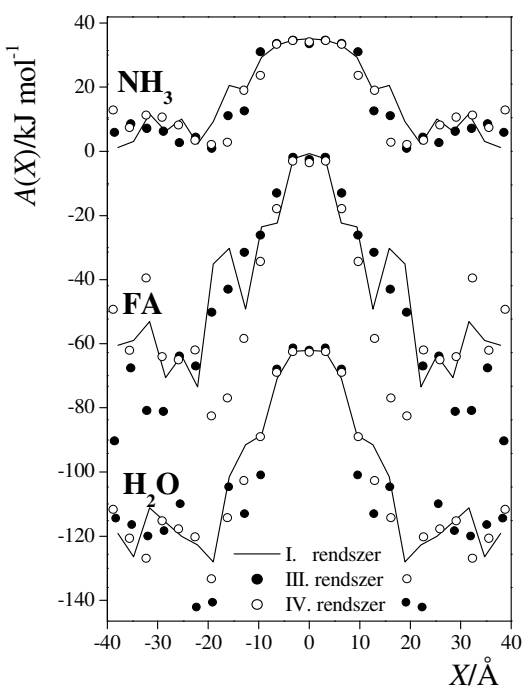
tartományban mindegyik molekula oldódási szabadenergiája alacsonyabb a koleszterint tartalmazó membránokban, mint tiszta DMPC-ben. Ennek oka az, hogy a koleszterin molekula, nagy fejcsoportja hiányának következtében, csökkenteni tudja ennek a zsúfolt régióknak a sűrűségét, alapvetően befolyásolva ezzel a molekulák membránon való áthatolásának a termodinamikáját. Látható az is, hogy míg a koleszterin jelenléte megváltoztatja az egyes molekulák oldódási szabadenergiáját ebben a régióban, a szabadenergia értéke érzéketlen a koleszterin koncentrációjára, a kapott profilok nem térnek el érdemben egymástól a 8 és 40% koleszterint tartalmazó rendszerben. Ez az eredmény azzal magyarázható, hogy az egyes molekulák oldódási szabadenergiáját (kellően kis koncentráció esetén) a legmélyebb energiájú lokális elrendeződések határozzák meg, hiszen a molekula úgyszintén mindig ilyen környezetben fordul elő.

(Ez a tény a CIW számítás során úgy jelentkezik, hogy csak a legmélyebb energiájú beillesztések adnak érdemi járulékot a III.4.2 egyenlet sokaságátlagához.) Vagyis ha egy molekula mélyebb energiájú pozíciót talál egy koleszterin közelében, akkor ezáltal csökken az oldódási szabadenergiája, a koleszterin koncentrációjának további növelése azonban ezen már tovább nem változtat.

Az egyes molekulák membránon keresztüli transzportjának szabadenergia-gátját a koleszterin különbözőképpen befolyásolja attól függően, hogy az adott molekula szabadenergia-profilja hogyan viselkedik a kritikus $10 \text{ \AA} < X < 20 \text{ \AA}$ tartományban. A kis, apoláros vagy gyengén poláros molekulákra számított szabadenergia-profilokat a III.4.21. ábra mutatja. Látható, hogy a kétatomos molekulákra kapott profilok mindegyike az $X > 20 \text{ \AA}$ tartományban konstans értéket mutat, 10 és $20 \text{ \AA}$ között a membrán közepe felé haladva fokozatosan csökkennek, majd a membrán belsejében szabadenergiájuk a vizes fázisra jellemzőnél $10\text{--}15 \text{ kJ/mol}$ -al alacsonyabb értéket vesz fel mindegyik rendszerben. E molekulák membránon való áthaladásának a szabadenergia-gátját tehát a koleszterin jelenléte nem befolyásolja. Némiképp más a helyzet a CO_2 molekula esetén. Itt a vizes és apoláros fázisbeli oldódási szabadenergia értéke nagyjából megegyezik, ezt a két



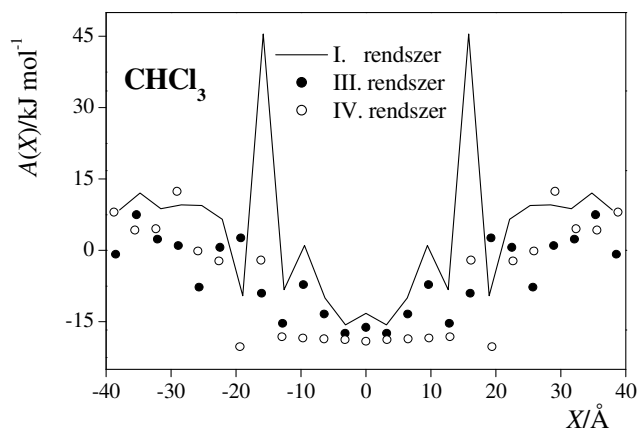
III.4.21. ábra Apoláros ill. gyengén poláros molekulák szabadenergia-profilja a különböző összetételű membránokban. A CO_2 -ra, O_2 -re ill. CO -ra kapott profilokat a jobb áttekinthetőség kedvéért -8.5 , $+8.5$ ill. $+20 \text{ kJ/mol}$ egységgel eltolva mutatjuk.



III.4.22. ábra Erősen poláros molekulák szabadenergia-profilja a különböző összetételű membránokban. A H_2O -re ill. NH_3 -ra kapott profilokat a jobb áttekinthetőség kedvéért -70 ill. $+30$ kJ/mol egységgel eltolva mutatjuk.

membránon való áthatolásának szabadenergia-gátja koleszterin jelenlétében megnő. Ez az eredmény összhangban van azzal a kísérleti ténnyel is, hogy a koleszterin csökkenti a foszfolipid membrán vízre vonatkozó permeabilitását [276,279]. Végezetül a CHCl_3 molekulák oldódási szabadenergia-profilja tiszta DMPC membránban igen éles maximumot mutat a koleszterin hatása szempontjából kritikus, $10 \text{ Å} < X < 20 \text{ Å}$ tartományban (III.4.23. ábra). Koleszterin jelenlétében ez a maximum eltűnik, és a CHCl_3 molekula oldódási szabadenergia-profilja hasonlóvá válik a kisebb apoláros vagy gyengén poláros molekulákéhoz (lásd a III.4.21. ábrát). Ilyen módon a CHCl_3 molekula membránon való áthatolásának szabadenergia-gátja koleszterin jelenlétében drasztikusan, kb. 30 kJ/mol -al lecsökken.

tartományt azonban a tiszta DMPC membrán fejcsoporti részében, a $10 \text{ Å} < X < 20 \text{ Å}$ rétegben egy kb. 8 kJ/mol nagyságú szabadenergia-gát választja el egymástól. Koleszterin jelenlétében ez a gát egy nagyjából ugyanilyen mély minimummá válik, miközben a membránon való áthatolás szabadenergia-gátja lényegében nem változik. Az erősen poláros molekulák esetén (III.4.22. ábra) az oldódási szabadenergia a vizes fázis és a fejcsoporti réteg határán, nagyjából $X = 20 \text{ Å}$ -nél a legmélyebb. A membrántól távolodva ez a szabadenergia az ikerionos fejcsoporti rész elektromos terének gyengülése miatt lassan, a membrán belseje felé haladva pedig a környezet fokozatosan egyre apolárosabbá válásával rohamosan nő. Mivel a koleszterin jelenléte ezeknek a molekuláknak az oldódási szabadenergiáját éppen ott csökkenti, ahol az egyébként is a legmélyebb, így e molekulák



III.4.23. ábra Kloroform szabadenergia-profilja a különböző összetételű membránokban.

III.4.6. A membránban található üregek vizsgálata

A kis molekulák membránon való áthatolását oldódási szabadenergiájuk profilja mellett a diffúzióállandójuk membránbeli profilja is befolyásolja. A membrán egy adott molekulára vonatkozó P permeabilitása az

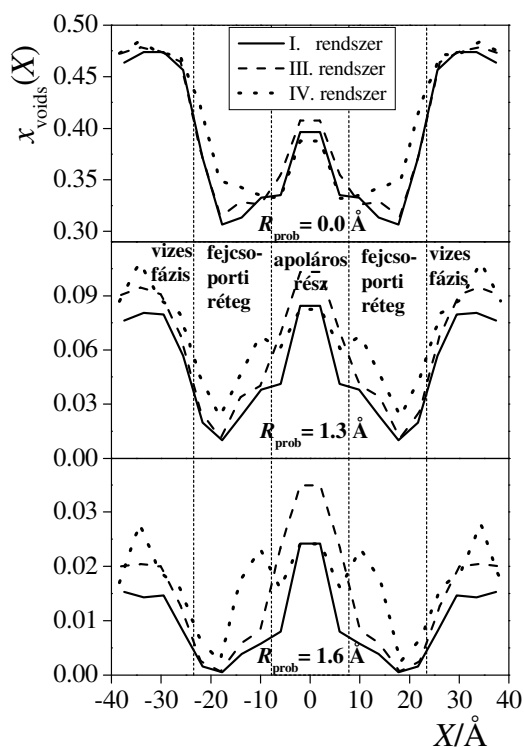
$$\frac{1}{P} = \int_{x_1}^{x_2} \frac{\exp(A(x)/k_B T)}{D(x)} dx \quad (\text{III.4.7})$$

egyenlet szerint számítható ki [295], ahol D az adott molekula diffúzióállandója. A diffúzióállandó membránbeli profiljának molekuláris dinamikai szimulációval történő számítása azonban a gyakorlatban igen nagy nehézségekbe ütközik a folyamatnak a szimulációk szokásos időskálájánál lényegesen lassabb volta miatt. Az irodalomban arra is csak néhány példa akad, hogy ezt a profilt mindössze néhány pontjában, beillesztett tesztreszecske diffúzióállandójának számításával határozzák meg [294,295,298]. A membránban található üregek részletes vizsgálata azonban, ha a diffúzióállandó profiljának kiszámítását nem is pótolhatja, némi támpontot mégis nyújthat a kis molekulák lehetséges diffúziójára vonatkozóan. Membránban található üregek tulajdonságait a mi ilyen irányú munkáink előtt csak Marrink és munkatársai vizsgálták részletesen tiszta DPPC kettős rétegben [293]. A mi munkáinkkal egyidőben hasonló számításokat végeztek Falck és munkatársai is kis koleszterintartalmú DPPC-koleszterin elegy membránokban [299]. Az üregek felderítését azonban a mi vizsgálatainktól eltérően mindkét esetben tesztpontok sokaságának a segítségével végezték.

Munkánk során részletesen vizsgáltuk a különböző lipid membránokban található üregek tulajdonságait: méretük, alakjuk és a irányuk eloszlását, illetve egymással való kapcsolódásukat a membrán különböző rétegeiben. Vizsgálatainkat az előzőekben tárgyalt tiszta DMPC, illetve három különböző összetételű DMPC-koleszterin elegy membrán mellett öt különböző, telítetlen foszfatidilkolin (PC) molekulákból álló tiszta membránon is elvégeztük. Az egyes membránokat felépítő molekulák első, a glicerinváz középső O atomját észteresítő faroklánc mindegyik esetben a 18 C atomot tartalmazó telített $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COO}$ csoport volt, míg a másik faroklánc az egyes esetekben az elágazásmentes 18:1 ω 9, 18:2 ω 6, 18:3 ω 3, 20:4 ω 6 illetve 22:6 ω 3 csoport volt, ahol az $n:d\omega p$ általános képletben n a lánc szénatomjainak a számát, d a láncban található, egy-egy CH_2 csoport által szeparált kettős kötések számát, p pedig a láncvégi CH_3 csoportot az első kettős kötéstől elválasztó szénatomok számát jelenti. (Az egyes molekulákat a továbbiakban a 18:0/ $n:d\omega p$

séma szerint jelöljük, utalva ezzel a 18 szénatombból álló első láncra is.) A kettős kötés körül a molekula konformációja minden esetben *cisz* volt. A telítetlen membránok kettős rétegei rétegenként 48 molekulából álltak, amit 2034 TIP3P potenciállal leírt vízmolekula hidratált. A lipid molekulákat most is a CHARMM22 erőterrel modelleztük. A telítetlen membránok molekuláris dinamikai szimulációját orosz partnereink, Rabinovich és Balabaev végezték. A membránban található üregeket a II.3.3. fejezetben részletesen ismertetett Voronoi S-diagramok módszerével derítettük fel orosz partnereink (Medvedev és Voloshin) erre a célra kifejlesztett programja [300] segítségével. Számításaink során az atomok átmérőjének Lennard-Jones σ paraméterük értékét tekintettük.

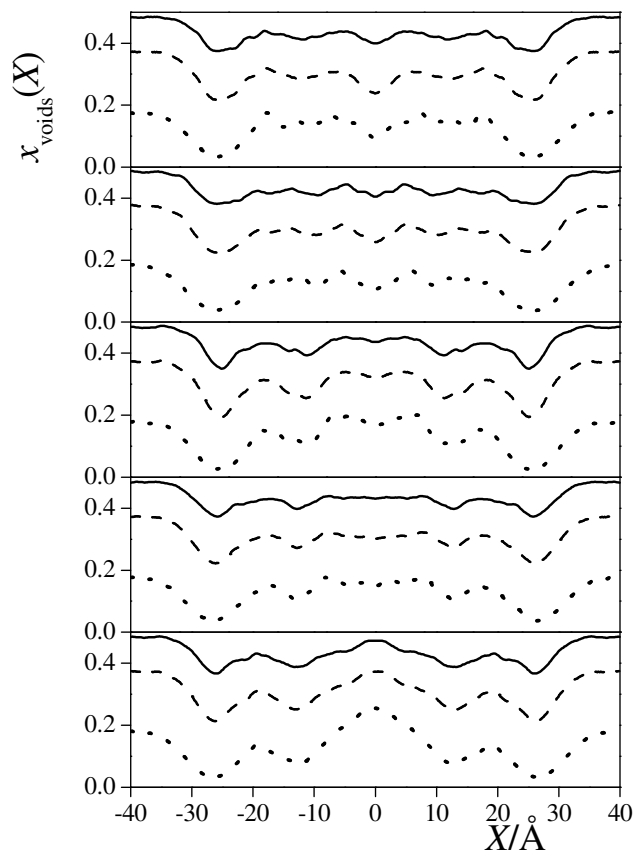
A teljes szabad térfogat (végtelenül kis próbatesszt számára is hozzáférhető üregek, azaz a rendszer atomok által nem lefedett része), illetve a különböző sugarú próbagömbök számára hozzáférhető üregek térfogatának arányát a teljes rendszerben a membrán normálisa mentén az I, III és IV összetételű DMPC-koleszterin elegy membránokban a III.4.24., a vizsgált telítetlen membránokban pedig a III.4.25. ábra mutatja. Látható, hogy a teljes szabad térfogat aránya mindegyik membrán esetén a vizes fázisban a legnagyobb. A nagyobb próbagömbök számára hozzáférhető szabad térfogat azonban a próbagömb R_{prob} sugarának növelésével egyre nagyobb részben található a membrán belső, apoláros rétegében. Az $1.3 - 1.4 \text{ \AA}$ sugarú próbagömbök számára hozzáférhető szabad térfogat részaránya az apoláros fázisban eléri a vizes fázisbeli értéket, $R_{\text{prob}} = 1.6 \text{ \AA}$ esetén pedig már meg is haladja azt. Ez azt jelenti, hogy ugyan kevesebb szabad térfogat található a membrán apoláros részében mint a vizes fázisban, ez a szabad térfogat azonban itt lényegesen rendezettebben, nagyobb üregeket alkotva van jelen, míg a vizes fázisban egyenletesebben oszlik el. A legkevesebb szabad térfogat a próbagömb sugarától függetlenül mindegyik membránban a fejcsoportok zsúfolt rétegében található. Az itteni szabad térfogat részarányát azonban a



III.4.24. ábra A $0.0 \text{ \AA}$ (felső panel), $1.3 \text{ \AA}$ (középső panel) ill. $1.6 \text{ \AA}$ (alsó panel) sugarú próbagömb számára hozzáférhető szabad térfogat aránya az I (folytonos vonal), III (szaggatott vonal) és IV (pontosított vonal) összetételű DMPC-koleszterin elegy membránban. A függőleges szaggatott vonalak a rendszerek három fázisra való önkényes felosztását szemléltetik.

koleszterin jelenléte növeli. Ez a megfigyelés összhangban van a koleszterinnek a fejcsoporti rész tulajdonságaira gyakorolt, előző fejezetekben tárgyalt hatásával. A koleszterin hatása a szabad térfogat apoláros fázisbeli részarányára összetettebb: kis mennyiségű koleszterin hozzáadása a rendszerhez növeli, míg nagy mennyiségű koleszterin csökkenti azt. Ez a jelenség azonban összhangban áll a koleszterinnek a membrán vastagságára gyakorolt, III.4.4.2. fejezetben tárgyalt hatásával, és okai is megegyeznek az ott tárgyaltakkal. Látható az is, hogy a foszfolipid molekulák telítetlenségének növekedésével a szabad térfogat részaránya az apoláros fázisban fokozatosan nő. Ennek oka a metilén-szeparált kettős kötésű láncok nagy flexibilitásában [301-303] rejlik: ezek a láncok gyakran nem nyúlnak be egészen a membrán közepéig. (Ez még a 18:0/22:6 ω 3 PC telítetlen láncja esetén is igaz, noha ez a lánc négy szénatommal hosszabb mint a molekula másik, telített szénláncja.) Ezzel összhangban a lánc telítetlenségének növelésével a szabad térfogat részarányának nem csak a membrán közepén való növekedését, hanem az apoláros fázis külső részén ($X = 10 \text{ \AA}$ körül) való csökkenését is megfigyelhetjük – itt találhatók ugyanis a membrán közepéig be nem nyúló, flexibilis telítetlen láncok végei is.

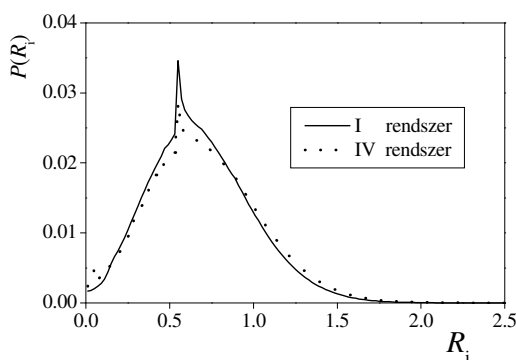
A tiszta DMPC és a 40% koleszterint tartalmazó DMPC-koleszterin elegy membrán $R_{\text{prob}} = 1.3 \text{ \AA}$ sugarú próbagömb számára hozzáférhető üregeinek térfogateloszlását a III.4.26. ábra mutatja a membrán három különböző rétegében (vizes fázis, fejcsoporti réteg, apoláros rész) külön-külön. Az egyes eloszlások egymáshoz nagyon hasonlóak, maximumuk minden esetben $10 \text{ \AA}^3$ körül található, csúcsuk pedig a nagy térfogatok felé exponenciális lecsengést mutat. Ez utóbbi tény a membránban fellépő nagy sűrűségfluktuációra, a szabad térfogat erősen inhomogén eloszlására utal [122,304]. Logaritmikus skálán ábrázolva azonban az eloszlások nagy térfogatoknál lecsengő részét (lásd az ábra betéiteit) láthatjuk, hogy a membránban található *legnagyobb* üregek mérete



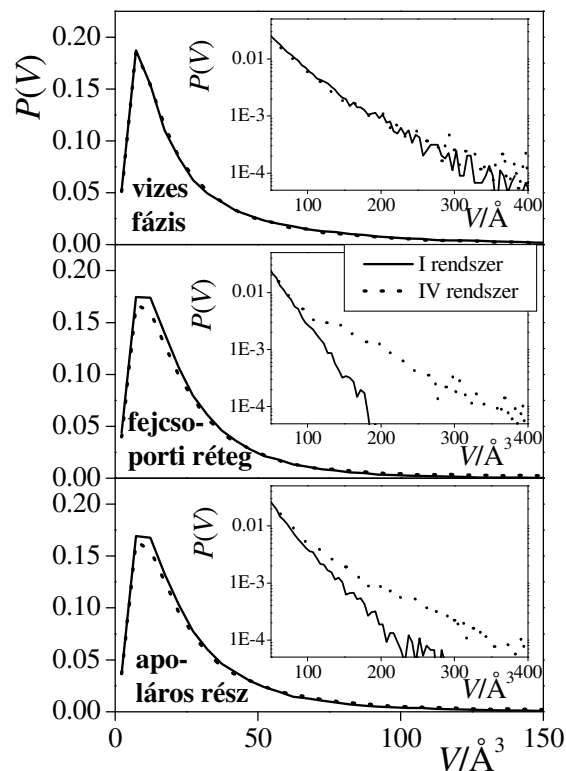
III.4.25. ábra A $0.0 \text{ \AA}$ (folytonos vonal), $0.8 \text{ \AA}$ (szaggatott vonal) ill. $1.4 \text{ \AA}$ (pontosított vonal) sugarú próbagömb számára hozzáférhető szabad térfogat aránya különböző telítetlen membránokban. Az $R_{\text{prob}} = 1.4 \text{ \AA}$ érték mellett kapott adatokat a jobb áttekinthetőség kedvéért háromszorosos nagyításban mutatjuk.

koleszterin jelenlétében sokkal, akár kétszer is nagyobb lehet a tiszta DMPC membránban levőkéénél. Így a 40% koleszterint tartalmazó elegy membránnak még a fejcsoporti rétegében is találhatók $300\text{--}400\text{ \AA}^3$ nagyságú, $1.3\text{ \AA}$ sugarú próbagömb számára hozzáférhető üregek. Ez a térfogat olyan nagy, hogy már magának a koleszterin molekula térfogatának a nagyságrendjébe esik. A számításokat nagyobb, $1.6\text{ \AA}$ sugarú próbagömbbel elvégezve is hasonló eredményeket kaptunk, a legnagyobb térfogatú üregek mérete a 40% koleszterint tartalmazó elegy membrán fejcsoporti rétegében is eléri a $300\text{ \AA}^3$ -öt.

A Voronoi S-diagram csúcspontjaiban található elemi üregek méreteloszlásának vizsgálata azonban meglepő eredményre vezetett. Ezen elemi üregek R_i sugarának eloszlása a teljes membránban (III.4.27. ábra) ugyanis már $2\text{ \AA}$ értéknél nullára csökken, jelezve, hogy ennél nagyobb sugarú üres gömb a membrán egyetlen pontján sem található. (Mivel a jelen tárgyalásban az üregek valóban fizikailag üres térrészeket jelentenek, az elemi üregek R_i sugara az üreg középpontjának a legközelebbi atom *felszínétől* való



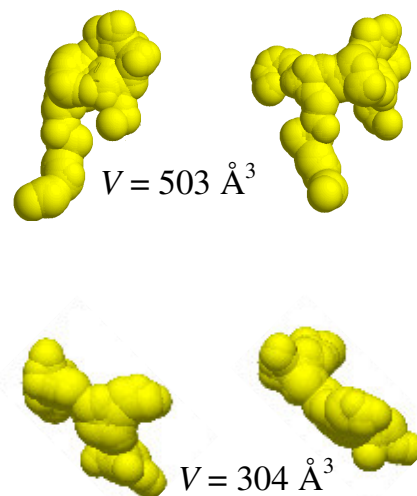
III.4.27. ábra Az elemi üregek R_i sugarának eloszlása az I (folytonos vonal) és IV (pontosított vonal) összetételű DMPC-koleszterin elegy membránokban.



III.4.26. ábra Az I (folytonos vonal) és IV (pontosított vonal) összetételű DMPC-koleszterin elegy membránok egyes rétegeiben található, $R_{\text{prob}} = 1.3\text{ \AA}$ sugarú próbagömb számára hozzáférhető üregek térfogatának eloszlása. Az ábra betétei az eloszlások nagy térfogatú részét mutatják logaritmikus skálán.

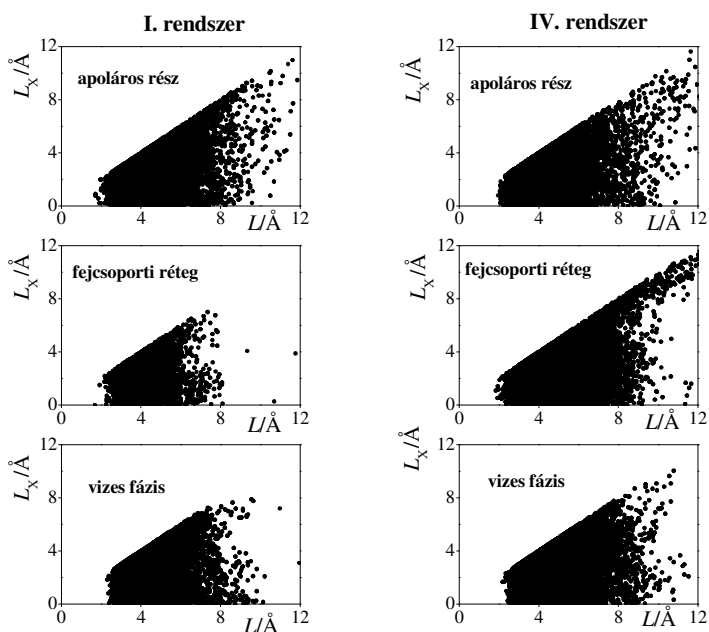
távolságát jelöli, ellentétben az előző fejezetben tárgyalt CIW számításoknál használatos R_{cav} üregsugártól, mely pusztán a számítások meggyorsítására szolgált, és így az egyszerűbb számíthatóság kedvéért a legközelebbi atom *középpontjától* való távolságot jelölte.) Más szóval az $1.3\text{ \AA}$ sugarú próbagömb számára hozzáférhető $300\text{--}400\text{ \AA}^3$, vagy az $1.6\text{ \AA}$ sugarú próbagömb számára hozzáférhető $250\text{--}300\text{ \AA}^3$ térfogatú üregek egyetlen pontjukon sem elég szélesek ahhoz, hogy

egy 2 Å sugarú próbagömb is elférjen bennük. Ezek az üregek tehát hosszan elnyúlt, esetleg elágazó vagy cikk-cakkos keskeny csatornák. Két ilyen üreget mutat két-két nézetből is a III.4.28. ábra.



Mivel az 1.3-1.6 Å sugarú próbagömbök mérete már a kis molekulák szélességének nagyságrendjébe esik, felmerül a kérdés, hogy milyen ezeknek a hosszan elnyúló, nagy térfogatú csatornaszerű üregeknek a membránhoz viszonyított orientációja, illetve hogy képesek-e átérni a teljes membránt vagy annak valamelyik rétegét. Ennek a kérdésnek a megválaszolása érdekében kiszámítottuk az egyes üregeknek a membrán normálisa mentén való L_x kiterjedését, illetve az üreg teljes L hosszát. (A teljes hossz megbecslése érdekében

III.4.28. ábra Két nagy üreg képe két-két nézetből a IV rendszerben.

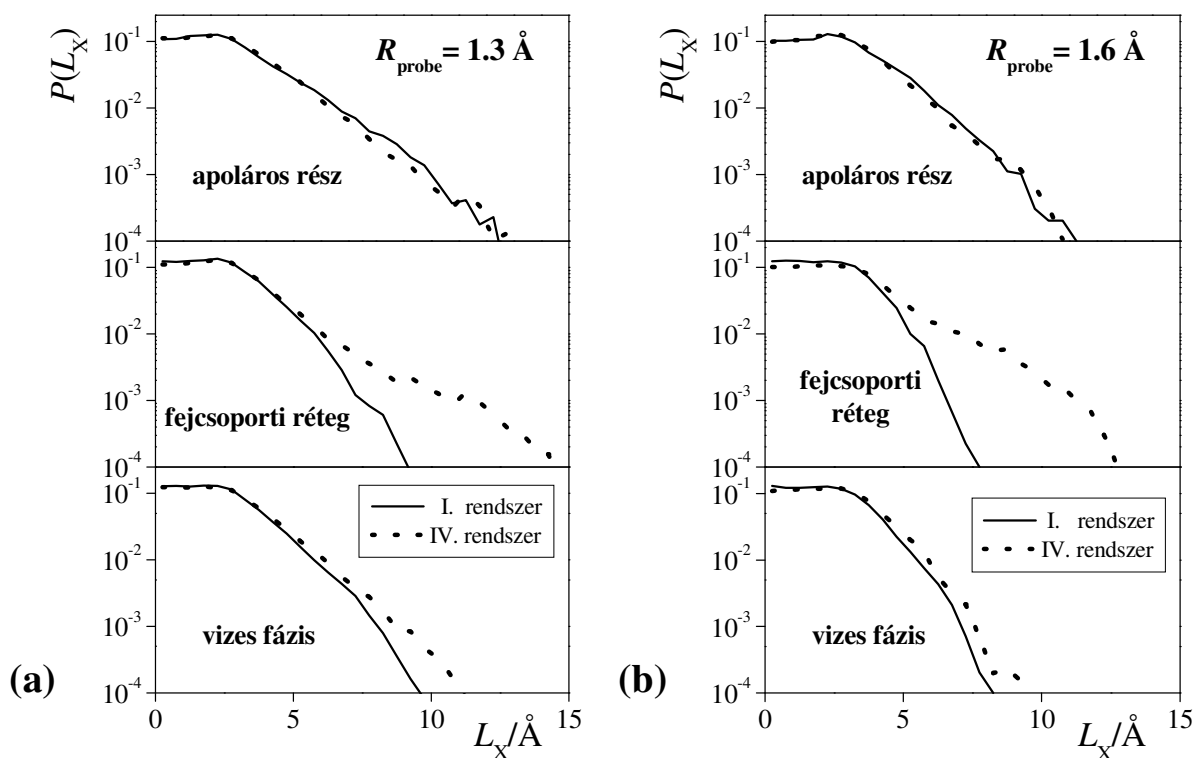


III.4.29. ábra Az $R_{\text{prob}} = 1.6$ Å sugarú próbagömb számára hozzáférhető üregek L_x - L diagramja az I (első oszlop) és IV (második oszlop) összetételű DMPC-koleszterin elegy membrán egyes rétegeiben.

ezen fiktív tömegek segítségével kiszámítottuk az üreg (fiktív) tömegközéppontját és tehetlenségi főtengelyét [305,306]. Az üreg hosszának ezután ennek a félgömbökkel lezárt hengernek a teljes hosszát tekintettük. Fontos megjegyezni azonban, hogy míg L értékét ilymódon egy, az eredeti üreget helyettesítő test segítségével becsültük meg, L_x értékét közvetlenül a valódi üreg adataiból számítottuk ki.)

A tiszta DMPC illetve a 40% koleszterint tartalmazó elegy membrán három különböző rétegében található, 1.6 Å sugarú

próbagömb számára hozzáférhető üregek L_X - L diagramját mutatja a III.4.29. ábra. Ezen a diagramon minden üreget egy-egy, a megfelelő (L, L_X) értékpárnál található pont reprezentál. Az üregek X tengely menti L_X kiterjedésének eloszlása a membrán különböző rétegeiben a III.4.30. ábrán látható. (Az egyes üregek helyét a membrán normálisa mentén a már említett fiktív tömegközéppontjuk alapján határoztuk meg.) Az L_X - L diagramról látható, hogy a koleszterin jelenlétében a fejcsoporti rétegben megjelenő nagyon nagy térfogatú üregek gyakorlatilag minden esetben a membrán síkjára nagyjából merőlegesen helyezkednek el. Látható az is, hogy a legnagyobb üregek sem tudnak 10-15 Å-nél nagyobb távolságot átérti a membrán normálisa mentén egyetlen esetben sem, így a kb. 50 Å széles membránt semmiképpen sem érhetik át. Nagyjából átérik azonban a fejcsoportok nagy sűrűségű rétegét, vagy a membrán apoláros belső részét. Mivel ezek a tartományok (nagyobb molekuláknál a fejcsoporti réteg, erősebben polárosoknál az apoláros rész) kulcsfontosságúak a különböző méretű és polaritású molekulák membránon keresztüli transzportjában (III.4.5. fejezet), a rajtuk keresztül hatoló, kis molekulákéval összemérhető szélességű üregek jelentősége igen nagy lehet a membrán permeabilitása szempontjából, hiszen éppen ott segíthetik a diffundáló molekulák gyors áthaladását, ahol azoknak az oldódási szabadenergiája éppen magas.



III.4.30. ábra Az (a) $R_{\text{prob}} = 1.3$ Å és (b) $R_{\text{prob}} = 1.6$ Å sugarú próbagömb számára hozzáférhető üregek X tengely menti L_X kiterjedésének eloszlása az I (folytonos vonal) és IV (pontozott vonal) összetételű DMPC-koleszterin elegy membrán egyes rétegeiben.