

ODDZIAŁYWANIE CHOLESTEROLU Z FOSFOLIPIDAMI W BŁONIE – BADANIA METODĄ SYMULACJI DYNAMIKI MOLEKULARNEJ

MOLECULAR SIMULATION STUDIES OF THE CHOLESTEROL-PHOSPHOLIPID INTERACTIONS

Tomasz RÓG, Marta PASENKIEWICZ-GIERULA

Zakład Biofizyki, Instytut Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Przeprowadzono 5-ns symulację dynamiki molekularnej uwodnionej błony w fazie ciekło-kryształicznej utworzonej z fosfatydylocholino dimyrystynowej (DMPC) i cholesterolu (Chol). Celem analiz uzyskanych trajektorii było wyjaśnienie mechanizmu efektu porządkującego i kondensacyjnego Chol na poziomie atomowym. Uporządkowanie łańcuchów węglowodorowych w błonie DMPC-Chol jest większe niż w czystej błonie DMPC. Najbardziej uporządkowane są łańcuchy cząsteczek DMPC sąsiadujących z gładką powierzchnią α Chol. W tej grupie stwierdzono zarówno spadek liczby konformacji *gauche*/łańcuch, jak i kąta nachylenia łańcuchów względem normalnej do powierzchni błony. Łańcuchy cząsteczek sąsiadujących z chropowatą powierzchnią β Chol były mniej uporządkowane niż cząsteczek sąsiadujących z powierzchnią α . Za efekt kondensacyjny Chol odpowiedzialny jest wzrost oddziaływań van der Waalsa między łańcuchami węglowodorowymi DMPC, a nie oddziaływania pomiędzy łańcuchami a pierścieniem sterydowym Chol.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; supl. 16: 277–283)

Słowa kluczowe: fosfatydylocholino, cholesterol, uporządkowanie błony

Summary: A 5-ns molecular dynamics simulation of the fully hydrated, liquid-crystalline bilayer membrane built of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and cholesterol (Chol) was performed. The primary aim of the analyses of generated trajectories was to investigate the atomic-level mechanisms of the Chol ordering and condensing effect. A strong increase in the chain order in the DMPC-Chol membrane as compared to the pure DMPC membrane, was observed. Alkyl chains of PCs, which were the nearest neighbours of the smooth face of Chol (α face), were the most ordered. For these molecules, a decrease in the number of *gauche* conformation/myristoyl chain as well as in the tilt of the chain, were

observed. PCs neighbouring the β face of Chol were less ordered than PCs neighbouring the α face. For the Chol condensing effect, an increase in the van der Waals interactions among PCs chains was responsible; interactions between hydrocarbon chains and cholesterol rings were weak.

(Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 277–283)

Key words: phosphatidylcholine, cholesterol, membrane order

WSTĘP

Cholesterol (Chol) jest istotnym składnikiem zwierzęcych błon komórkowych. Jego średnia zawartość w tych błonach wynosi ~ 30 mol% (20% wagowych) wszystkich lipidów, a w błonie komórkowej erytrocytów może osiągać aż do 50 mol%. W błonach wewnątrzkomórkowych zawartość Chol jest mniejsza niż w błonie komórkowej i waha się od 3% wagowych w błonach mitochondrium do 8% w aparacie Golgiego. Obserwuje się niesymetryczne rozmieszczenie Chol pomiędzy zewnętrzną, bogatszą w Chol i cytoplazmatyczną, uboższą w Chol warstwę błony komórkowej. Powszechne występowanie Chol w zwierzęcych błonach komórkowych oraz precyzyjna regulacja jego zawartości w różnego typu błonach wskazuje, że cholesterol pełni tam istotne biologiczne funkcje.

Wyjaśnienie wpływu Chol na strukturę i dynamikę błon jest przedmiotem szeroko zakrojonych badań biofizycznych. Przegląd aktualnych poglądów na temat biofizycznych aspektów funkcjonowania Chol w błonie zebrany jest w pracach [1, 5, 7, 21, 22]. Wykazano, że Chol obniża przepuszczalność błony dla wody, jonów i małych obojętnych cząsteczek, kontroluje fazowe zachowanie błony, zwiększa jej mechaniczną wytrzymałość oraz kontroluje kształt komórki. Pełnienie tych funkcji jest możliwe, ponieważ na poziomie molekularnym Chol wywołuje wzrost uporządkowania łańcuchów węglowodorowych, obniżenie płynności błony oraz wywołuje jej kondensację.

Cholesterol jest najczęściej występującym w przyrodzie przedstawicielem sterydów, grupy naturalnych związków chemicznych o podobnej strukturze pierścieniowej. Badania porównawcze wpływu Chol i innych sterydów na właściwości błon modelowych i biologicznych wykazały, iż struktura cząsteczki Chol jest optymalna dla oddziaływania z błoną [1, 8]. Wszelakie zmiany w strukturze cząsteczki Chol, takie jak zmiana konformacji grupy hydroksylowej, jej brak lub jej estryfikacja, czy też obecność dodatkowych podstawników w pierścieniu sterydowym obniżają jej wpływ na właściwości fizyczne błony.

SYMULACJE DYNAMIKI MOLEKULARNEJ

W pracy badano dwa modele błon:

- (1) błona zbudowana z 72 cząsteczek fosfatydylocholine dimyrystynowej (DMPC) i 1622 cząsteczek wody (błona DMPC),

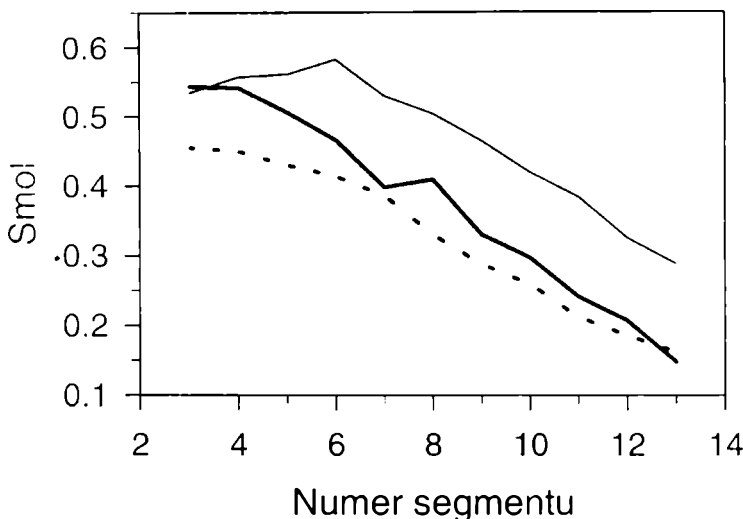
(2) błona zbudowana z 56 cząsteczek DMPC, 16 cząsteczek Chol oraz 1622 cząsteczek wody (błona DMPC-Chol).

Przeprowadzono 5ns symulacje dynamiki molekularnej obu modeli przy użyciu programu AMBER 4.0. Do analiz użyto wyników uzyskanych w trakcie ostatnich 2.5 ns symulacji. Dokładne informacje dotyczące budowy błon, procesu ich równoważenia oraz porównania uzyskanych wyników z danymi eksperymentalnymi zamieszczono w pracach [10, 11, 12, 13].

WPLYW CHOLESTEROLU NA UPORZĄDKOWANIE ŁAŃCUCHÓW WĘGLOWODOROWYCH

Wprowadzenie Chol do błony fosfolipidowej w fazie ciekłokrystalicznej powoduje wzrost uporządkowania łańcuchów węglowodorowych [2, 3, 9, 15, 19]. Postulowanym mechanizmem wzrostu uporządkowania błony jest spadek średniej liczby konformacji *gauche* w łańcuchach węglowodorowych. Badania eksperymentalne nie dostarczyły jednak jednoznacznych danych na temat wpływu Chol na tę liczbę. Wcześniejsze badania metodą symulacji dynamiki molekularnej błon zawierających 50 mol% Chol wykazały spadek liczby konformacji *gauche* [18], natomiast w błonach zawierających 12 i 22 mol% Chol nie wykazały takiego spadku [13, 15, 20]. Czynnikiem, który również wpływa na uporządkowanie błony, jest nachylenie łańcuchów węglowodorowych względem normalnej do powierzchni błony. W przeprowadzonych symulacjach dynamiki molekularnej stwierdzono, iż pod wpływem Chol nachylenie to maleje.

Analizy błony DMPC-Chol wykazały, iż wzrost uporządkowania jest największy w grupie cząsteczek DMPC, które znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie cząsteczek Chol. Łańcuchy węglowodorowe tych cząsteczek charakteryzują się mniejszym nachyleniem względem normalnej do powierzchni błony niż pozostałe cząsteczki DMPC w błonie. Wśród cząsteczek DMPC sąsiadujących z cząsteczkami Chol można wyróżnić dwie grupy cząsteczek: pierwsza, to cząsteczki sąsiadujące z płaską powierzchnią α pierścieni sterydowych, na której nie ma żadnych podstawników oraz druga, to cząsteczki sąsiadujące z chropowatą powierzchnią β , na której znajdują się dwa podstawniki metylowe. Cząsteczki sąsiadujące z powierzchnią α Chol są bardziej uporządkowane niż cząsteczki sąsiadujące z powierzchnią β i charakteryzują się najmniejszą liczbą konformacji *gauche*/łańcuch i najmniejszym kątem nachylenia łańcuchów węglowodorowych względem normalnej do powierzchni błony. Na rysunku 1 przedstawiono profile parametru uporządkowania cząsteczek sąsiadujących z płaską i chropowatą powierzchnią Chol oraz nie sąsiadujących z Chol. Na rysunku 2 przedstawiono struktury cząsteczek DMPC, które sąsiadują z płaską i chropowatą powierzchnią Chol oraz nie sąsiadującą z Chol.



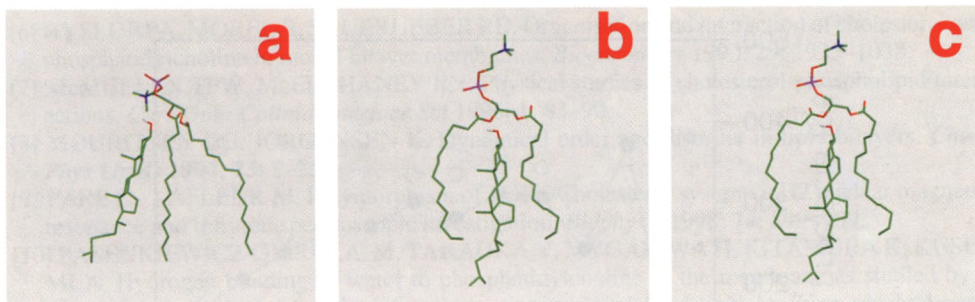
RYSUNEK 1. Profil parametru uporządkowania Smol wzdłuż łańcucha węglowodorowego w grupie lipidów sąsiadujących z płaską powierzchnią cholesterolu (cienka linia ciągła), z chropowatą powierzchnią cholesterolu (pogrubiona linia ciągła) i w grupie lipidów nie sąsiadujących z cholesterollem (linia przerywana)

MECHANIZM EFEKTU KONDENSACYJNEGO CHOLESTEROLU

Efekt kondensacyjny Chol w błonie fosfolipidowej polega na wzroście gęstości powierzchniowej błony po wprowadzeniu do niej Chol. Zjawisko to manifestuje się również zmniejszeniem pola powierzchni poprzecznej przypadającej na cząsteczkę fosfolipidu w błonie. Został on wykazany zarówno metodami eksperymentalnymi [16, 17], jak i metodą symulacji dynamiki molekularnej [13, 15, 18, 20].

Postulowanym mechanizmem efektu kondensacyjnego na poziomie atomowym jest wzrost oddziaływań van der Waalsa w błonach zawierających Chol [16]. Przeprowadzone symulacje dynamiki molekularnej jednoznacznie wykazały, iż taki wzrost ma miejsce i jest największy w środkowej części łańcuchów węglowodorowych.

Wcześniejsze wyniki eksperymentalne pozwoliły na zaproponowanie dwóch modeli efektu kondensacyjnego. W pierwszym główną rolę odgrywiają oddziaływania pomiędzy pierścieniami Chol a łańcuchami węglowodorowymi PC [4], a w drugim, tylko pomiędzy łańcuchami węglowodorowymi PC [6]. Przeprowadzone symulacje wykazały, iż oddziaływania van der Waalsa pomiędzy pierścieniem steroidowym Chol a łańcuchami węglowodorowymi są słabe, natomiast pomiędzy samymi łańcuchami są one silne.



RYSUNEK 2. Struktura cząsteczki cholesterolu i DMPC sąsiadującej (a) z płaską powierzchnią cholesterolu, (b) z chropowatą powierzchnią cholesterolu oraz (c) nie sąsiadującej z cholesterolu

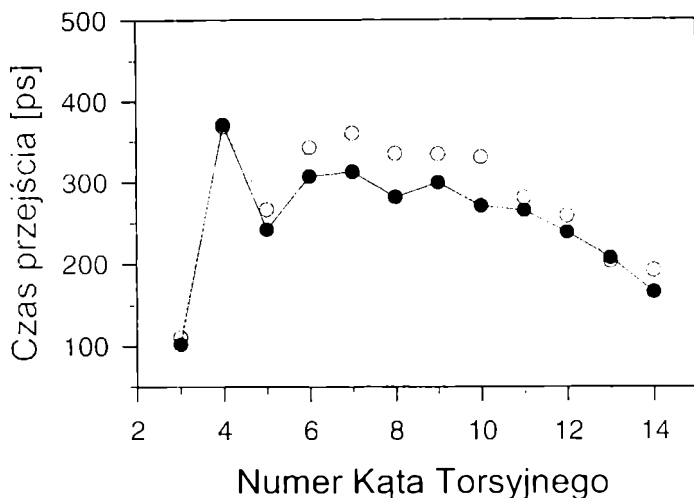
WPLYW CHOLESTEROLU NA DYNAMICZNE PARAMETRY BŁONY

Obecność Chol w błonie powoduje obniżenie ruchliwości cząsteczek fosfolipidów. Efekt ten określany jest jako obniżenie płynności błony. Przeprowadzone badania symulacyjne wykazały, iż cholesterol spowolnia izomeryzację *trans-gauche* w łańcuchach węglowodorowych DMPC. Efekt ten jest nieznacznie silniejszy w grupie cząsteczek sąsiadujących z cząsteczkami Chol. Na rysunku 3 przedstawiono profile czasu izomeryzacji *trans-gauche* wzdłuż łańcuchów węglowodorowych w błonie zawierającej i nie zawierającej Chol.

Obserwuje się również spowolnienie dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej cząsteczek DMPC. Krótka skala czasowa symulacji dynamiki molekularnej nie pozwala jednak na pełną charakterystykę procesów dyfuzyjnych. Niemniej dla cząsteczek DMPC sąsiadujących z pierścieniem steroidowym obserwuje się wyższą wartość współczynnika dyfuzji translacyjnej niż dla cząsteczek nie sąsiadujących z cząsteczkami Chol. Prawdopodobnie wynika to ze słabszych oddziaływań pomiędzy pierścieniem a łańcuchami węglowodorowymi PC oraz silniejszych oddziaływań pomiędzy samymi łańcuchami.

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone symulacje dynamiki molekularnej wykazały dużą przydatność tej metody do badania obszaru hydrofobowego błony. Komputerowe modele błon dobrze odtwarzają wiele właściwości błon znanych z badań eksperymentalnych, takich jak kształt profilu parametru uporządkowania czy też wywołany obecnością Chol efekt porządkujący i kondensacyjny. Przeprowadzone analizy modeli błon DMPC i DMPC-Chol pozwoliły na wskazanie mechanizmów tych efektów na poziomie atomowym. Są to:



RYSUNEK 3. Czas izomeryzacji *trans-gauche* (średni czas, po którym obserwuje się zmianę konformacji kąta torsyjnego) w błonie DMPC dla kolejnych kątów torsyjnych wzdłuż łańcucha węglowodorowego (pełne symbole) i DMPC-Chol (puste symbole)

- Mechanizm wzrostu uporządkowania nasyconych łańcuchów węglowodorowych pod wpływem cholesterolu polegający na zmniejszeniu liczby konformacji *gauche* oraz kąta nachylenia łańcuchów względem normalnej do powierzchni błony. Największy wzrost uporządkowania zachodzi wśród cząsteczek DMPC znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie płaskiej powierzchni α cholesterolu.
- Mechanizm kondensacji błony pod wpływem cholesterolu polegający na wzroście oddziaływań van der Waalsa zachodzących pomiędzy grupami metylenowymi łańcuchów węglowodorowych PC. Oddziaływania van der Waalsa zachodzące pomiędzy atomami łańcuchów PC a atomami pierścieni sterydowych są słabe.

LITERATURA

- [1] BITTMAN R. Has nature designed the cholesterol side chain for optimal interaction with phospholipid. *Subcellular Biochemistry* 1997; **28**: 145–171.
- [2] DAVIS JH. The description of membrane conformation, order and dynamics by ^2H -NMR. *Biochim Biophys Acta* 1983; **737**: 117–171.
- [3] DOULIEZ JP, LEONARD A, DUFOURC EJ. Restatement of order parameters in biomembranes: calculation of C-C bond order parameters from C-D quadrupolar splitting. *Biophys J* 1995; **68**: 1727–1739.
- [4] DUFOURC EJ, PARISH E, CHITRAKORN S, SMITH ICP. Structural and dynamical details of cholesterol-lipid interactions as revealed by deuterium NMR. *Biochemistry* 1984; **23**: 6062–6071.
- [5] FINEAN JB. Interaction between cholesterol and phospholipid in hydrated bilayer. *Chem Phys Lipids* 1990; **54**: 147–156.

- [6] HYSLOP PA, MOREL B, SAUERHEBER RD. Organisation and interaction of cholesterol and phosphatidylcholine in model bilayer membranes. *Biochemistry* 1990; **29**: 1925–1038.
- [7] McMULLEN TPW, McELCHANEY RN. Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 1996; **1**: 83–90.
- [8] MOURITSEN OG, JORGENSEN K. Dynamical order and disorder in lipid bilayers. *Chem Phys Lipids* 1994; **73**: 2–25.
- [9] PARE C, LAFLEUR M. Polymorphism of POPE/Cholesterol system: a H2 nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopic investigation. *Biophys J* 1998; **74**: 899–909.
- [10] PASENKIEWICZ-GIERULA M, TAKAOKA Y, MYGAIAWA H, KITAMURA K, KUSUMI A. Hydrogen bonding of water to phosphatidylcholine in the membrane as studied by a molecular dynamics simulation: location, geometry and lipid-lipid bridging via hydrogen bonded water. *J Phys Chem* 1997; **101**: 3677–3691.
- [11] PASENKIEWICZ-GIERULA M, RÓG T. Conformations, orientations and time scales characterising dimyristoylphosphatidylcholine bilayer membrane. Molecular dynamics simulation studies. *Acta Biochem. Pol* 1997; **44**: 607–624.
- [12] PASENKIEWICZ-GIERULA M, TAKAOKA Y, MYGAIAWA H, KITAMURA K, KUSUMI A. Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes: a molecular dynamics simulation study. *Biophys J* 1999; **76**: 1228–1240.
- [13] PASENKIEWICZ-GIERULA M, RÓG T, KITAMURA K, KUSUMI A. Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer polar region: a molecular simulation study. *Biophys J* 2000; **78**: 1376–1389.
- [14] RAMSTED B, SLOTTE JP. Interaction of cholesterol sphingomyelins and acyl-chain-matched phosphatidylcholines: a comparative study of the effect of the chain length. *Biophys J* 1999; **76**: 908–915.
- [15] ROBINSON AJ, RICHARDS WG, THOMAS PJ, HANN MA. Behaviour of cholesterol and its effect on head group and chain conformations in lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J* 1995; **68**: 164–170.
- [16] SMABY JM, MOMSEN MM, KULKARNI VS, BROWN RE. Cholesterol-induced interfacial area condensations of galactosylceramides and sphingomyelins with identical acyl chains. *Biochemistry* 1996; **35**: 5696–5704.
- [17] SMABY JM, MOMSEN MM, BROCKMAN HL, BROWN RE. Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in the interfacial elasticity induced by cholesterol. *Biophys J* 1997; **73**: 1492–1505.
- [18] SMONDYREV AM, BERKOWITZ ML. Structure of dipalmitoylphosphatidylcholine/ cholesterol bilayer at low and high cholesterol concentrations: molecular dynamics simulation. *Biophys J* 1999; **77**: 2075–2089.
- [19] TROUARD TP, NEVZOROV AA, ALAM TM, JOB CC, ZAJICEK J, BROWN MF. Influence of cholesterol on dynamics of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium NMR relaxation. *J Chem Phys* 1999; **110**: 8802–8818.
- [20] TU K, KLEIN ML, TOBIAS DJ. Constant-pressure molecular dynamics investigation of cholesterol effects in a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer. *Biophys J* 1998; **75**: 2147–2156.
- [21] YEAGLE PL. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 1985; **822**: 267–287
- [22] YEAGLE PL. Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie* 1990; **73**: 1303–1310.