

Različiti aspekti mehanizma djelovanja antimikrobnih peptida kroz simulacijske studije

Maleš, Matko

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:418237>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT

The logo for 'dabar', featuring a stylized red and black graphic above the word 'dabar' in a lowercase, sans-serif font.

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI



Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Poslijediplomski sveučilišni doktorski studij

Biofizika

Doktorski rad

**RAZLIČITI ASPEKTI MEHANIZMA
DJELOVANJA ANTIMIKROBNIH PEPTIDA
KROZ SIMULACIJSKE STUDIJE**

Matko Maleš

Split, Ožujak 2023



University of Split
Faculty of Science
PhD Study of Biophysics

Doctoral thesis

**DIFFERENT ASPECTS OF THE MECHANISM OF
ACTIONS OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES
THROUGHOUT SIMULATION STUDIES**

Matko Maleš

Split, March 2023

Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za fiziku, Poslijediplomski sveučilišni doktorski studij Biofizika

RAZLIČITI ASPEKTI MEHANIZMA DJELOVANJA ANTIMIKROBNIH PEPTIDA KROZ SIMULACIJSKE STUDIJE

Doktorski rad autora **Matka Maleša** kao dio obaveza potrebnih da se dobije doktorat znanosti, izrađen pod vodstvom mentorice **izv. prof. dr. sc. Larise Zoranić**.

Dobiveni akademski naziv i stupanj: doktor prirodnih znanosti iz polja fizika.

Povjerenstvo za ocjenu i obranu dokorskog rada u sastavu:

1. _____

dr. sc. Dražen Petrov

(Institute of Molecular Modeling and Simulation, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria, predsjednik)

2. _____

izv. prof. dr. sc. Željana Bonačić Lošić

(Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Splitu, članica)

3. _____

izv. prof. dr. sc. Marija Raguž

(Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, članica)

4. _____

izv. prof. dr. sc. Damir Kovačić

(Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Splitu, zamjenski član)

potvrđuje da je disertacija obranjena dana 24. 3. 2023.

Vršitelj dužnosti voditelja dokorskog studija: izv. prof. dr. sc. Damir Kovačić

DEKAN: prof. dr. sc. Mile Dželalija:

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet

Doktorski rad

RAZLIČITI ASPEKTI MEHANIZMA DJELOVANJA ANTIMIKROBNIH PEPTIDA KROZ SIMULACIJSKE STUDIJE

Matko Maleš

Rad je izrađen na Prirodoslovno-matematičkom i Pomorskom fakultetu u Splitu

Sažetak

Metodom molekulske dinamike istraženi su mehanizmi djelovanja i karakteristična svojstva triju vrsta antimikrobnih peptida (AMP-a) (adepanina-1, *dl*PGLa-H te šest njegovih analoga kiadina i anisaxina-2S) u interakciji s modelima plazma membrana Gram-pozitivnih, unutarnjih i vanjskih membrana Gram-negativnih bakterija, te neutralnih membrana eukariota. Izvedene su atomističke, združene atomske i krupnozrnate simulacije. Simulacije istražuju važnost strukturiranja peptida, njihove fleksibilnosti, udruživanja u klastere i drugih svojstava važnih za antimikrobno djelovanje. Pokazano je kako asocijacije peptida mogu pomoći postavljanju peptida u položaj i konformaciju povoljnu za njihovo umetanje u membranu. Analiza kako broj i položaj aminokiseline glicin mijenja svojstva peptida i utječe na njegovu interakciju s membranom pokazala je da je važniji položaj, nego sam broj glicina u sekvenci peptida. Potvrđeno je da mehanizam djelovanja AMP-a može uključivati potpunu ekstrakciju lipida iz gornjeg membranskog sloja ostvarenu uz velike lokalne koncentracije peptida na površini membrane. Moguće je da je takva ekstrakcija lipida prvi korak u mehanizmu djelovanja i da rezultirajuća asimetrija u lokalnoj gustoći lipida u dva membranska sloja može smanjiti energetska barijeru za umetanje peptida. Ovaj rad doprinosi boljem razumijevanju mehanizma djelovanja i otkrivanju antibiotskog potencijala antimikrobnih peptida.

(175 stranica, 92 slike, 11 tablica, 178 literaturnih navoda, 3 priloga, jezik izvornika je hrvatski)

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Sveučilišnoj knjižnici u Splitu, Knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Ključne riječi: antimikrobni peptidi, simulacije molekulske dinamike, asocijacije peptida, mehanizam djelovanja, α -uzvojnica

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Larisa Zoranić

Ocjenjivači:

1. dr. sc. Dražen Petrov
2. izv. prof. dr. sc. Željana Bonačić Lošić
3. izv. prof. dr. sc. Marija Raguž

Rad prihvaćen: Sjednica Vijeća Prirodoslovno-matematičkog fakulteta 23. 2. 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split
Faculty of Science

Ph.D. thesis

DIFFERENT ASPECTS OF THE MECHANISM OF ACTIONS OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES THROUGHOUT SIMULATION STUDIES

Matko Maleš

Thesis performed at University of Split, Faculty of Science and Maritime Faculty

Abstract

Using the molecular dynamics method, the mechanisms of action and characteristic properties of three types of antimicrobial peptides (AMPs) (adepanin-1, *di*PGLa-H and six of its analogues kiadins and anisaxin-2S) were investigated in interaction with plasma membrane models of Gram-positive, inner and outer membranes of Gram-negative bacteria, and neutral membranes of eukaryotes. Atomistic, united atom and coarse-grained simulations were performed. The simulations investigate the importance of peptide structuring, their flexibility, clustering and other properties important for antimicrobial activity. It is shown how peptide associations can help to place peptides in a position and conformation favorable for their insertion into the membrane. Analysis of how the number and position of the amino acid glycine changes the properties of the peptide and affects its interaction with the membrane showed that the position is more important than the number of glycine in the peptide sequence. It has been confirmed that the mechanism of action of AMP can include the complete extraction of lipids from the upper membrane layer achieved with high local concentrations of peptides on the membrane surface. It is possible that this type of lipid extraction is the first step in the mechanism of action, and that the resulting asymmetry in the local density of lipids in the two membrane layers can reduce the energy barrier for peptide insertion. This thesis contributes to a better understanding of the mechanism of action and the antibiotic potential of antimicrobial peptides.

(175 pages, 92 figures, 11 tables, 178 references, 3 appendices, original in Croatian)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, University Library in Split, Library of the Faculty of Science University of Split

Keywords: antimicrobial peptides, molecular dynamic simulations, peptide aggregation, mode of action, α -helix

Supervisor: Izv. prof. dr. sc. Larisa Zoranić

1. Dražen Petrov, Ph. D.
2. Željana Bonačić Lošić, Assoc. Prof.
3. Marija Raguž, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 23. 2. 2023

*„I ought never to act except in such a way
that I could also will that my maxim
should become a universal law“*

Immanuel Kant

ZAHVALE

Najljepša hvala dragoj mentorici **izv. prof. dr. sc. Larisi Zoranić** s kojom sam 2019. počeo rad na ovoj temi i koja je svo vrijeme bila nepresušan izvor stručnih savjeta, podrške, razumijevanja i strpljenja, sve to neovisno o radnom vremenu, imao sam puno sreće što sam dobio priliku s takvom osobom surađivati.

Hvala članovima povjerenstva, **dr. sc. Draženu Petrovu, izv. prof. dr. sc. Željani Bonačić Lošić, izv. prof. dr. sc. Mariji Raguž, doc. dr. sc. Damiru Kovačiću**, kao i **doc. dr. sc. Željki Sanader Maršić**, na susretljivosti te korisnim i zanimljivim komentarima i sugestijama tijekom izrade disertacije. Zahvaljujem i svim članovima Vijeća doktorskog studija Biofizike na susretljivosti, posebno bivšim voditeljima i dragim profesorima **prof. dr. sc. Pašku Županoviću i prof. dr. sc. Mili Dželaliji, prof. emer. Davoru Juretiću** te bivšem dekanu PMF-a **prof. dr. sc. Nikoli Koceiću-Bilanu**. Tajnici doktorskog studija **dr. Ireni Bitunjac** sam veliki dužnik, bila je ne samo tajnik, nego i voditelj i savjetnik i psiholog, da je mobilna aplikacija dao bih joj pet zvjezdica. Zahvaljujem svim profesorima s doktorskog studija i kolegicama doktorandicama s kojima je sve bilo puno lakše, posebno **doc. dr. sc. Martini Požar i doc. dr. sc. Luciji Krce. Dr. sc. Tomislavu Rončeviću** dugujem puno na pomoći i danoj prilici za suradnju, toliko da zaslužuje posebnu rečenicu.

Zahvaljujem mentorici na Pomorskom fakultetu **prof. dr. sc. Aniti Gudelj** na savjetima i podršci, a posebno na tome što mi je omogućila da se u punom vremenu, van nastavnih aktivnosti, posvetim doktoratu. Zahvaljujem i svim članovima uprave Pomorskog fakulteta koji su mi izlazili u susret za baš svaku moju potrebu vezanu uz doktorat, posebno bivšem dekanu **prof. dr. sc. Nikoli Račiću** i sadašnjem dekanu **prof. dr. sc. Peri Vidanu**. Velika hvala i kolegama sa Pomorskog fakulteta na podršci, posebno kolegama sa **Zavoda za opće i zajedničke predmete**.

Velika hvala članovima tima iz Centra za napredno računanje i modeliranje sa Sveučilišta u Rijeci na rijetko viđenoj susretljivosti u vezi s korištenjem superračunala "Bura", voditelju **prof. dr. sc. Ladi Kranjčeviću, Gordanu Janešu, dipl. ing. i dr. sc. Vedranu Miletiću** i posebno **doc. dr. sc. Željku M. Svedružiću** na nesebičnoj ogromnoj pomoći.

Hvala na strpljivosti i razumijevanju **svim prijateljima i poznanicima** za koje "nisam imao vremena", posebno onima koji su unatoč tomu bili velika potpora.

Posebnu zahvalnost dugujem široj i užoj obitelji, **Jeleni Maleš prof., Stipi Malešu dipl. ing, doc. dr. sc. Josipu Malešu dr. med.**, a posebno **prof. emer. mami** na njenim molitvama u ključnim trenucima.

Na koncu velika hvala prorektoru **prof. dr. sc. Borisu Malešu** na konstantnoj podršci i bivšem komentoru, dragom profesoru i prijatelju **prof. dr. sc. Franji Sokoliću**, bez koga ništa od ovog ne bi bilo.

Sadržaj

Lista slika	I
Lista tablica	V
Lista simbola i kratica	VI
1 UVOD	1
1.1 Antimikrobni peptidi	1
1.2 Simulacije AMP-a metodama molekulske dinamike	3
1.3 Cilj istraživanja.....	6
1.4 Metodologija.....	7
2 MATERIJALI I METODE	11
2.1 Adepantin-1	11
2.1.1 Dizajn i biološka aktivnost.....	11
2.1.2 Simulacije.....	13
2.2 Kiadini	19
2.2.1 Dizajn i biološka aktivnost.....	19
2.2.2 Simulacije.....	21
2.2.3 Eksperimentalne metode	24
2.3 Anisaxin-2S	25
2.3.1 Dizajn i biološka aktivnost.....	25
2.3.2 Simulacije.....	27
3 REZULTATI	29
3.1 Adepantin-1	29
3.1.1 Istraživanje interakcije peptida s unutarnjim membranama AA modeliranjem.....	29
3.1.2 Istraživanje interakcija peptida s unutarnjom membranom Gram-negativnih bakterija CG modeliranjem.....	39
3.1.3 Promjene u membranama izazvane interakcijom s peptidima	45
3.1.4 Interakcija peptida s vanjskom membranom Gram-negativnih bakterija	50
3.1.5 Diskusija.....	54
3.2 Kiadini	57
3.2.1 Interakcije i kontakti peptida.....	58

3.2.2	Utjecaj na strukturu peptida	60
3.2.3	Uloga amfipatičnosti	62
3.2.4	Pozicioniranje i vezanje peptida.....	63
3.2.5	Strukturna stabilnost kiadina određena CD spektroskopijom i površinskom plazmonsom rezonancijom	69
3.2.6	Diskusija.....	71
3.3	Anisaxin-2S	74
3.3.1	Simulacija s jednim peptidom, P/L=1/256.....	75
3.3.2	Simulacije sa šest peptida, P/L=1/128.....	76
3.3.3	Simulacije sa 12 peptida, P/L=1/64.....	77
3.3.4	Simulacije sa dvadeset i četiri peptida, P/L=1/32.	78
3.3.5	Usporedba s melitinom, P/L=1/32	81
3.3.6	Diskusija.....	82
4	ZAKLJUČAK	86
5	EXTENDED SUMMARY	91
6	KRATKI ŽIVOTOPIS	96
7	POPIS PUBLIKACIJA	97
8	LITERATURA	98
9	PRILOZI.....	114
9.1	Kreiranje početnih struktura	114
9.1.1	Adepantin-1	114
I.	Kreiranje početnih struktura u AA-1 simulacijama	114
II.	Kreiranje početnih struktura u AA-12 simulacijama	120
III.	Kreiranje početnih struktura u CG simulacijama	123
IV.	Kreiranje početnih struktura u CG2AA simulacijama	127
V.	Kreiranje početnih struktura u simulacijama vanjske membrane Gram-negativnih bakterija.....	130
9.1.2	Kiadini.....	132
I.	Kreiranje anionske POPE:POPG membrane	132
II.	Kreiranje neutralne DLPC membrane.....	137
III.	Kreiranje sistema anionska membrana + peptid ili neutralna membrana + peptid.....	142
9.1.3	Anisaxin-2S	145

I.	Kreiranje rasporeda 12 anisaxina-2S u obliku zvijezde.....	145
9.2	Dodatni podaci.....	147
9.2.1	Adepantin-1	147
9.2.2	Kiadini.....	160
9.2.3	Anisaxin-2S.....	165
9.3	Skripte za analize.....	167

Lista slika

Slika 1 Broj radova u zadnjih 30 godina s ključnim riječima „antimicrobial peptides“	1
Slika 2 Načini djelovanja AMP-a.	2
Slika 3 Početna struktura adepantina-1 kako predviđa C-QUARK ima jaku amfipatsku distribuciju hidrofobnih (magenta) i hidrofilnih (žutih) ostataka [94]	11
Slika 4 Svojstva adepantina-1, rezultati <i>HeliQuest</i> mrežnog kalkulatora	12
Slika 5 Molekule lipida i lipopolisaharida (LPS) korištene u simulacijama	13
Slika 6 Struktura molekula lipopolisaharida.....	14
Slika 7 Tipovi i ilustracije interakcijskih centara adepantina-1 (c), POPE (a) i POPG (b) lipida u CG simulacijama	15
Slika 8 Početne konfiguracije (pogled sa strane i odozgo) u nekim AA simulacijama.....	16
Slika 9 Početne konfiguracije (pogled sa strane i odozgo) u CG simulacijama	17
Slika 10 Projekcije uzvojnica kiadina, dobivene pomoću <i>Heliquest</i> aplikacije	19
Slika 11 Početne konfiguracije u MD simulacijama kiadina s neutralnom DLPC i anionskom POPE:POPG membranom.....	22
Slika 12 Početna struktura anisaxina-2S u obliku uzvojnice kako ju predviđa C-QUARK.....	26
Slika 13 Svojstva anisaxina-2S – rezultati <i>HeliQuest</i> mrežne aplikacije	26
Slika 14 Prikaz adepantina-1 u interakciji s Gram-negativnom (gore) i Gram-pozitivnom (dolje) bakterijskom membranom.....	30
Slika 15 Udaljenosti od središta membrane do centra mase (COM) lizina (žuta linija) i hidrofobnih (magenta linija) ostataka kao funkcija vremena.....	31
Slika 16 Sekundarna struktura peptida u AA-1 simulacijama.....	32
Slika 17 Profili gustoće hidrofobnih (magenta) i pozitivno nabijenih Lys ostataka (žuto), te peptida (crno) i P atoma lipida (zeleno) u AA-1 simulacijama	33
Slika 18 Prikazi dvanaest peptida adepantina-1 u interakciji s unutarnjom membranom Gram-negativne bakterije	34
Slika 19 Prikaz prostornih distribucija hidrofobnih (magenta) i hidrofilnih (žuto) ostataka u različitim trenutcima u AA-12 simulacijama	34
Slika 20 Površina peptida dostupna otapalu (engl. <i>solvent accessible surface</i> , SASA) kao funkcija vremena u AA-12 simulacijama.....	35
Slika 21 Broj klastera kao funkcija vremena za simulacije dvanaest peptida s (a) gram-negativnim, (b) gram-pozitivnim i (c) neutralnim membranama	36
Slika 22 Analiza klastera izračunata Gromacsovom programom <i>clustsize</i> i konačne konfiguracije klastera u AA-12 POPE:POPG simulacijama.....	36
Slika 23 Analiza klastera izračunata Gromacsovom programom <i>clustsize</i> i konačne konfiguracije klastera u AA-12 Gram+ simulacijama.....	37
Slika 24 Analiza klastera izračunata Gromacsovom programom <i>clustsize</i> i konačne konfiguracije klastera u AA-12 POPC simulacijama	37

Slika 25 Udaljenosti od središta membrane do centra mase (COM) lizina (žuta linija) i hidrofobnih (magenta linija) ostataka kao funkcija vremena, za simulacije dvaju peptida (AA-2)	38
Slika 26 Prikazi dvaju peptida adepantina-1 u interakciji s membranom Gram-negativne bakterije	38
Slika 27 Nastanak velikih agregata u ranim fazama (~15 ns) simulacija CG-12 (a) i CG-24 (b)	40
Slika 28 Agregati peptida na kraju simulacija CG-12 (25 μ s) (a) i CG-24 (42.5 μ s) (b)	40
Slika 29 Transformacija krupnozrnatog u atomistički model	41
Slika 30 Zadnje konfiguracije u CG2AA simulacijama (500 ns), sa dvanaest (a) i dvadeset i četiri (b) peptida	41
Slika 31 Analiza klastera izračunata Gromacsovim <i>clustsize</i> programom za CG-12 i CG2AA-12 simulacije	42
Slika 32 Analiza klastera izračunata Gromacsovim <i>clustsize</i> programom za CG-24 i CG2AA-24 simulacije	43
Slika 33 Profili gustoće hidrofobnih (magenta) i pozitivno nabijenih Lys ostataka (žuto), usrednjeni u označenim vremenskim intervalima, u AA-12 (lijevo) i CG2AA-12 (desno) simulacijama	44
Slika 34 Površina peptida dostupna otapalu (SASA) kao funkcija vremena u AA-12 (lijevo) i CG2AA-12 (desno) simulacijama peptida u interakciji sa POPE:POPG membranom	44
Slika 35. Omjer gornje (na koju se prvotno vežu peptidi) i donje površine po lipidu (APL) usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns (lijevo) i debljina membrane usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns (desno) za izdvojene AA i CG2AA simulacije	45
Slika 36 Površina po lipidu (APL) i debljina membrane kao funkcija vremena za čiste membranske sustave (AA-0 simulacije)	47
Slika 37 Površina po lipidu (APL) i debljina membrane kao funkcija vremena za AA simulacije Gram-negativne membrane (POPE:POPG)	47
Slika 38 APL i debljina membrane kao funkcija vremena za AA simulacije Gram-pozitivne membrane (POPG:Lys-PG:PVCL)	48
Slika 39 APL i debljina membrane kao funkcija vremena simulacije za AA simulacije neutralne membrane (POPC)	48
Slika 40 APL i debljina membrane za CG2AA simulacije Gram-negativne membrane (POPE:POPG) kao funkcija vremena	49
Slika 41 Parametar reda $-S_{CH}$ za acilne lance sn-1 (lijevo) i sn-2 (desno) kao funkcija indeksa atoma ugljika	50
Slika 42 Vanjske membrane Gram-negativnih bakterija s 2 O-antigena (glatka) u interakciji s jednim peptidom (a) ili dvanaest peptida (b) nakon 500 ns odnosno 400 ns	51
Slika 43 Vanjske membrane Gram-negativnih bakterija bez O-antigena (hrapava) u interakciji s jednim peptidom (a) ili dvanaest peptida (b) nakon 100 ns	52
Slika 44 Površina po lipidu (APL) i debljina membrane (bez LPS-a) kao funkcija vremena za čiste membranske sustave (AA-0 simulacije)	53

Slika 45 Profili gustoće komponenata vanjske membrane usrednjeni tijekom naznačenog vremena	53
Slika 46 Prikazi hidrofobnih kontakata u dvopeptidnoj asocijaciji	56
Slika 47 Broj kontakata kao funkcija vremena između hidrofилnih odnosno hidrofobnih regija peptida i P atoma DLPC (lijevo) i POPE:POPG membrana (desno)	58
Slika 48 Prosječan broj kontakata između svih atoma koji pripadaju peptidima i fosfatnim atomima membrane usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns simulacije	59
Slika 49 Prosječan broj kontakata između pojedinačnih atoma lizina i membranskih fosfatnih atoma usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns simulacije.....	59
Slika 50 Vremenska evolucija sekundarnog strukturiranja tijekom 300 ns u DLPC (lijevo) i POPE:POPG (desno) sustavima	60
Slika 51 Udio strukture α -uzvojnice za svaki kiadin, usrednjeno tijekom vremena simulacije od 300 ns	61
Slika 52 3D hidrofobni moment, izračunat pomoću 3D-HM mrežnog kalkulatora	62
Slika 53 Profili gustoće za simulacije kiadina s DLPC membranom (<i>case1</i>)	65
Slika 54 Profili gustoće za simulacije kiadina s DLPC membranom (<i>case2</i>)	66
Slika 55 Profili gustoće za simulacije kiadina s POPE:POPG membranom (<i>case1</i>)	67
Slika 56 Profili gustoće za kiadin peptide s POPE:POPG membranom (<i>case2</i>).....	68
Slika 57 CD spektri kiadina u prisutnosti neutralnih (DOPC [Rončević T. i drugi, rad u pripremi]) i anionskih (PG:dPG [54]) LUV-ova	69
Slika 58 Sekundarna struktura anisaxina-2S tijekom interakcije s POPE:POPG membranom u simulaciji I.....	75
Slika 59 Početno (a) i konačno (b i c , pogled sa strane i odozgo) stanje u simulaciji I	75
Slika 60 Početno (0 ns), dva karakteristična (73 ns i 100 ns) i konačno stanje (1000 ns) u simulaciji II-a	76
Slika 61 Početno (a , b) i karakteristično (c , d) stanje u simulaciji III-1	77
Slika 62 Početno (a , b) i konačno stanje (c , d) u simulaciji V-a	79
Slika 63 Početno (a) i karakteristično stanje (b) u simulaciji IV-a	79
Slika 64 Početno (a) i konačno stanje (b) u simulaciji IV-b	80
Slika 65 Početno (a) i konačno stanje (b) u simulaciji V-b.....	80
Slika 66 Početno (0 ns) i konačno stanje (400 ns) u simulacijama VI-a (a) i VII-a (b)	81
Slika 67 Početno (0 ns) i konačno stanje (200 ns) u simulacijama VI-b (a) i VII-b (b)	82
Slika 68 Prosječna debljina POPE/POPG membrane kao funkcija omjera peptida i lipida (P/L) u simulacijama I, II-a, III-1 i IV-a.....	83
Slika 69 Inicijalni raspored adeptantina-1 u simulacijama AA-12a	120
Slika 70 Inicijalni raspored adeptantina-1 u simulacijama AA-12b.....	122
Slika 71 Inicijalni raspored anisaxina-2S u simulacijama AA-12.....	145
Slika 72 Sekundarna struktura dvaju peptida u AA-2 simulacijama sa POPE:POPG (gore) i PG:Lys-PG:CL (dolje) membranom.....	148
Slika 73 Sekundarna struktura dvanaest peptida u AA-12 POPE:POPG simulacijama.....	149

Slika 74 Sekundarna struktura dvanaest peptida u AA-12 PG:LysPG:CL simulacijama	150
Slika 75 Sekundarna struktura dvanaest peptida u AA-12 POPC simulacijama.....	151
Slika 76 Sekundarna struktura dvanaest peptida u CG2AA-12 (lijevo) i CG2AA-24 (sredina i desno) POPE:POPG simulacijama.	152
Slika 77 Profili površina lipida u posljednjem stanju ($t = 1\mu\text{s}$) u AA-12 POPE:POPG simulacijama.....	153
Slika 78 Profili površine lipida u posljednjem stanju ($t = 1\mu\text{s}$) u AA-12 POPE:LysPG:CL simulacijama.....	154
Slika 79 Profili površine lipida u konačnom stanju ($t = 25 \mu\text{s}$) u CG-12 POPE:POPG simulaciji	155
Slika 80 Profili površina lipida (gornji red) i debljine membrane (donji red) u konačnom stanju ($t = 500 \text{ ns}$) CG2AA-12 POPE:POPG simulacije.....	156
Slika 81 Profili površina lipida (gornji red) i debljine membrane (donji red) u konačnom stanju ($t = 500 \text{ ns}$) CG2AA-24 POPE:POPG simulacije.....	157
Slika 82 Parametri reda – S_{CH} za acilne lance sn-1 (lijevo) i sn-2 (desno) kao funkcija indeksa atoma ugljika.....	158
Slika 83 Parametri reda – S_{CH} za acilne lance sn-1 (lijevo) i sn-2 (desno) kao funkcija indeksa atoma ugljika.....	159
Slika 84 Parametri reda – S_{CH} za acilne lance sn-1 (lijevo) i sn-2 (desno) kao funkcija indeksa atoma ugljika.....	159
Slika 85 Prosječan broj kontakata tijekom zadnjih 100 ns simulacije između hidrofilnih (Lys) odnosno hidrofobnih (Ile, Val, Ala, Leu) regija peptida i P atoma DLPC (lijevo) i POPE:POPG membrane (desno).....	160
Slika 86 Iznos 3D-HM vektora i kut između 3D-HM vektora i +z osi	160
Slika 87 Vizualni prikaz 3D-HM rezultata za kiadine i diPGLa-H u trenutku 0 ns	161
Slika 88 Prikaz 3D-HM rezultata u trenutku 300 ns za kiadine i diPGLa-H u interakciji s DLPC membranom.....	162
Slika 89 Prikaz 3D-HM rezultata u trenutku 300 ns za kiadine i diPGLa-H u interakciji s POPE:POPG membranom.....	163
Slika 90 Senzogrami površinske plazmonske rezonancije (SPR) pri vezanju kiadina na neutralne DOPC LUV-ove.....	164
Slika 91 Početno (0 ns), dva karakteristična (7 ns i 200 ns) i konačno stanje (500 ns) u simulaciji II-b.....	165
Slika 92 Početno (0 ns) dva karakteristična (170 ns i 407 ns) i konačno (500 ns) stanje u simulaciji III-2.....	166

Lista tablica

Tablica 1 Sažetak MD simulacija adepantina-1 sa različitim modelima membrana	14
Tablica 2 Sekvence i osnovne fizičko-kemijske karakteristike kiadina određene pomoću <i>Heliquest</i> aplikacije	20
Tablica 3 Antibakterijska aktivnost i toksičnost diPGLa-H i kiadina [54].	21
Tablica 4 Sažeti popis simulacija anisaxina-2S i melitina u interakciji s POPE:POPG i POPC modelima membrana.	27
Tablica 5 Moduli 3D-HM vektora i kut između vektora i +z osi.....	30
Tablica 6 APL, ukupna površina lipida i prosjek debljine membrane usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns simulacije.....	46
Tablica 7 Prosječna površina po lipidu (APL) i ukupna površina lipida modela vanjske membrane <i>E. coli</i>	52
Tablica 8 Iznos 3D-HM vektora i kut između 3D-HM vektora i +z osi	63
Tablica 9 Početne dimenzije simulacijskih sustava u simulacijama adepantina-1 sa membranama	147
Tablica 10 Detalji procesa ekvilibracije u simulacijama adepantina-1 sa membranama.....	147
Tablica 11 Neke vrijednosti konstanti sila izražene u mjernim jedinicama koje se koriste u Gromacsu i CHARMM-u.....	147

Lista simbola i kratica

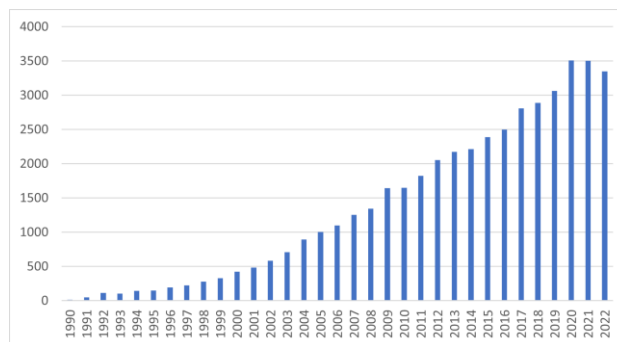
AA	atomistički (engl. <i>all-atom</i>);
AFM	sustav za mikroskopiju atomskih sila (engl. <i>atomic force microscope</i>);
AMP	antimikrobni peptid (engl. <i>antimicrobial peptide</i>);
APL	površina po lipidu (engl. <i>area per lipid</i>);
CD	cirkularni dikroizam (engl. <i>circular dichroism</i>);
CG	krupnozrnato (engl. <i>coarse grained</i>);
COM	centar mase (engl. <i>center of mass</i>);
DLPC	<i>1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine</i> ;
DOPC	<i>1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocholine</i> ;
DPPG	<i>1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol</i> ;
HC50	koncentracija koja uništava 50% crvenih krvnih stanica (engl. <i>concentration causing 50% hemolysis</i>);
LPS	<i>lipopolysaccharide</i> ;
LUV	velika unilamelarna vezikula (engl. <i>large unilamellar vesicle</i>);
Lys-PG	<i>lysylphosphatidylglycerol</i> ;
MD	molekulska dinamika (engl. <i>molecular dynamics</i>);
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (engl. <i>minimal inhibitory concentration</i>);
OM	vanjska membrana (engl. <i>outer membrane</i>);
P/L	omjer broja peptida i lipida (engl. <i>peptide to lipid ratio</i>);
POPC	<i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine</i> ;
POPE	<i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine</i> ;
POPG	<i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol</i> ;
PVCL2	<i>1,10-palmitoyl-2,20-vacenoil-cardiolipin</i> ;
PVPE	<i>1-palmitoyl-2-cis-vaccenic-phosphatidylethanolamine</i> ;
PVPG	<i>1-palmitoyl-2-cis-vaccenic-phosphatidylglycerol</i> ;
QSAR	kvantitativni odnos strukture i aktivnosti (engl. <i>quantitative structure-activity relationship</i>);
SASA	površina dostupna otapalu (engl. <i>solvent accessible surface</i>);
SI	indeks selektivnosti (engl. <i>selectivity index</i>);
SPR	površinska plazmonska rezonancija (engl. <i>surface plasmon resonance</i>);
TFE	<i>trifluoroethanol</i> ;
UA	združeno-atomski (engl. <i>united-atom</i>);
3D-HM	trodimenzionalni hidrofobni moment (engl. <i>three-dimensional hydrophobic moment</i>);

1 UVOD

1.1 Antimikrobni peptidi

U borbi protiv patogena najčešće se koriste antibiotici, no zbog njihovog velikog korištenja bakterije su razvile različite vrste otpornosti. Zahtjev za ubrzanim rješavanjem problema je velik jer je nedavno procijenjeno da najmanje 700 000 ljudi godišnje umre od infekcija otpornih na antimikrobne lijekove [1] [2]. Paralelno, razvoj novih antibiotika je usporen te se javlja potreba za pronalaženjem novih vrsta antimikrobnih spojeva [3]. Jedna od obećavajućih klasa takvih spojeva su antimikrobni peptidi (AMP) koji su prisutni u svim organizmima kao prva linija obrane protiv patogena. To su mali, uglavnom kationski peptidi koji sadrže do 100 aminokiselina, od kojih veliku obitelj čine linearni peptidi u obliku α – uzvojnice. Antimikrobni peptidi djeluju brzo, pokrivaju široki spektar mikroba, te patogeni teže razvijaju otpornost na njihove mehanizme djelovanja [4]. Osim direktnog djelovanja na patogene, antimikrobni peptidi mogu djelovati i posredno poticanjem imunološkog odgovora organizma na infekciju [5], a djelotvorni su i protiv mikrobnih biofilmova te stanica raka [6].

Istraživanja AMP-a ubrzala su se tijekom zadnjeg desetljeća, tako da je u 2022. godini broj radova na tu temu iznosio oko 3350 u bazi WOS (sl. 1).



Slika 1 Broj radova u zadnjih 30 godina s ključnim riječima „antimicrobial peptides“ u bazi WOS (www.webofscience.com)

Potencijalno terapijsko djelovanje istražuje se za antimikrobne peptide izolirane iz različitih organizama [7], posebice žaba [8]. Također, dizajniraju se novi antimikrobni peptidi s ciljem jačeg antimikrobnog djelovanja i smanjene toksičnosti na ljudske stanice, što zahtijeva dobro poznavanje svojstava i načina djelovanja [9]. Kao mjera selektivnosti AMP-a obično se koristi indeks selektivnosti (SI, engl. *selectivity index*) (koji se ponekad naziva i „terapijski indeks“) [10]:

$$SI = \frac{HC_{50}}{MIC}$$

gdje je HC_{50} koncentracija peptida potrebna za liziranje 50% eritrocita (engl. *concentration causing 50% hemolysis*), a MIC minimalna koncentracija peptida potrebna za zaustavljanje rasta

bakterija (engl. *minimal inhibitory concentration*). Antimikrobni peptidi s indeksom selektivnosti ≥ 20 smatraju se jako selektivnima prema bakterijama [11].

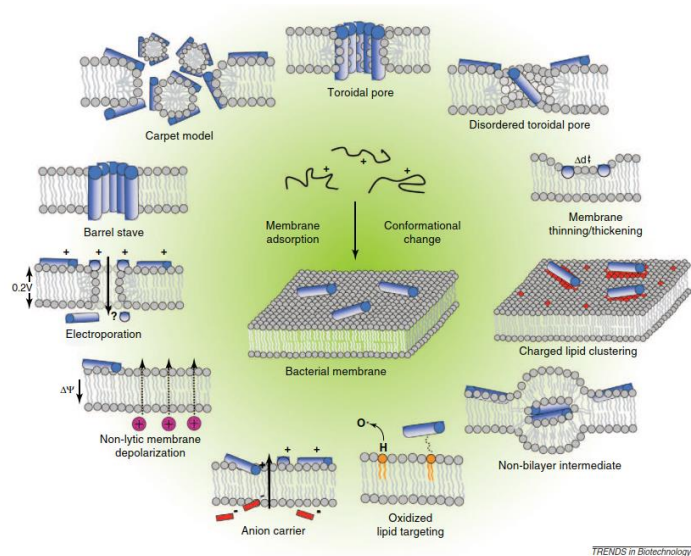
Jedan od pristupa u istraživanju AMP-a je definiranje molekularnih deskriptora koji povezuju strukturalna svojstva s biološkom aktivnošću, koristeći statističke metode (engl. *quantitative structure-activity relationship*, QSAR) [12]. Razvijeni su i različiti računalni alati koji pomažu u otkrivanju peptida koji će imati poželjna svojstva, kao što su: “*Mutator*” - program koji u zadanom peptidu pronalazi mutacije primjenom kojih se povećava terapijski indeks [13], “*Designer*” - algoritam koji iz zadanih fizikalno-kemijskih ograničenja konstruira primarne strukture peptida s velikim terapijskim indeksom [11], „*iAMPpred*“ – program koji predviđa antibakterijsko, antiviralno i antigljivično djelovanje zadanog peptida na temelju strukturalnih i fizikalno-kemijskih karakteristika [14], i drugi [15].

Više je poznatih baza antimikrobnih peptida (DRAMP, DBAASPv3, CAMPr3, APD3, itd.) [7] [16], na primjer baza DRAMP ima ukupno 22 480 antimikrobnih peptida (pristup siječanj 2023.), od čega 4 462 peptida izolirana iz živih organizama (<http://dramp.cpu-bioinfor.org/>).

Istraživanje mehanizma djelovanja AMP-a otkriva veliku razinu složenosti i raznolikosti [17], kao što prikaz na **sl. 2** opisuje. Ipak mogu se izdvojiti neka zajednička svojstva AMP-a koja su značajna za antimikrobno djelovanje [9] [18]:

- Ukupni pozitivni naboj peptida koji pogoduje vezanju na negativnu bakterijsku membranu,
- Postojanje hidrofilnih i hidrofobnih regija, koje olakšavaju umetanje u hidrofobni sloj membrane,
- Strukturna fleksibilnost koja omogućuje prelazak iz konformacije koju peptid ima u otopini u konformaciju s kojom interagira s membranom [19].

Osim toga, antimikrobno djelovanje između ostalog ovisi o vrsti lipida u membranama [20] [21] te udruživanju peptida i međudjelovanju s drugim spojevima [22] [23].



Slika 2 Načini djelovanja AMP-a. Preuzeto iz članka Nguyen i suradnici (2011) [24] uz dopuštenje izdavača (Elsevier)

Smatra se da postoje dva glavna načina djelovanja AMP-a [25]:

- 1) Direktno djelovanje na membranu stvaranjem bačvastih (alameticin [26]) odnosno toroidalnih (melitin [27], lakticin Q [28]) pora, kroz koje istječe unutarstanični materijal ili uništavanje membrane miceliranjem njenih dijelova (LL-37 [29], aurein 1.2 [30]),
- 2) Translokacija peptida kroz membranu u unutrašnjost stanice gdje peptidi djeluju na inhibiciju vitalnih unutarstaničnih procesa u bakteriji [31] (buforin II [32], indolicidin [33], human β - defensin [34]).

Općenito, djelovanje AMP-a na membranu odvija se u dva koraka (tzv. model dva stanja, engl. *two-state* model) [35]: i) vezanje peptida na membranu uzrokovano u prvom redu elektrostatskim, a potom i hidrofobnim interakcijama s membranskim lipidima. Ukoliko je broj peptida premalen u odnosu na broj lipida (mali peptid/lipid P/L omjer), oni će ostati vezani i neaktivni, ii) stvaranje defekata u membranama (stanjivanje, stvaranje toroidalnih ili bačvastih pora, miceliranje) događa se tek kad je P/L omjer veći od graničnog omjera za određenu vrstu membrane i peptida. Detalji opisa svakog od koraka u modelu dva stanja još uvijek nisu u potpunosti poznati. Prostorno-vremenska karakteristika procesa doprinosi da su in vitro eksperimenti zahtjevni [36] pa se kao njima komplementaran alat koriste simulacije molekulske dinamike (MD) [22] [37] [38].

1.2 Simulacije AMP-a metodama molekulske dinamike

Zbog ograničenosti računalnih resursa u prvim simulacijama korišteni su implicitni membranski modeli u kojima membrane i otapala nisu modelirani eksplisitno (kao atomi) već se koristio opis preko funkcije potencijala [39] [40]. Implicitni modeli omogućuju dulja vremena simulacija i daju dobre rezultate primjerice za vezanje, umetanje i orijentaciju peptida unutar membrane, ali nedostaju im bitni detalji koji karakteriziraju pojedinačne molekule i njihovu raznovrstnost u membranama bakterijskih i ljudskih stanica te njihove interakcije s peptidima [41].

Bolji uvid u detalje interakcija proteina i membrane dobio se primjenom eksplicitnih atomskih (engl. *all-atom*, AA) i krupnozrnatih (engl. *coarse grained*, CG) modela. Korištenje atomskih modela zahtijeva poznavanje trodimenzionalnih struktura lipida i proteina koje definiraju početne konfiguracije, te poznavanje svih interakcija između atoma, odnosno definiciju parametara polja sila [42] [43]. Također, razvile su se numeričke metode za računanje elektrostatskih doprinosa, numeričkih termostata i barostata, metoda koje su ubrzavale simulacije (na primjer liste susjeda) i slično [44]. Optimizacija se primjenjuje pri traženju balansa između pouzdanosti simulacije, razine detalja potrebnih za specifični proces i računalnih resursa [45].

Napredak računalne tehnologije i razvoj modela različitih lipida omogućio je simuliranje kompleksnijih sustava, na primjer lipidnog dvosloja s više različitih vrsta lipida, u interakciji s više peptida [46] [43]. Leontiadou i suradnici 2006. prvi opisuju cijeli mehanizam spontanog nastanka pore najprije za magainin-H2 [47], a potom i za melitin [48], od početne agregacije nekoliko peptida, vezanja za membranu, do umetanja i stvaranja pore. Simulacije potvrđuju da je preduvjet stvaranja pore dovoljno veliki P/L omjer [49] što je ranije uočeno eksperimentalno, primjerice

neutronske raspršenjem [50] i orijentiranim spektrima cirkularnog dikroizma (CD, engl. *circular dichroism*) [51]. Nadalje pomenute simulacije ukazuju na važnu ulogu udruživanja peptida pri umetanju u membranu i kreiranju pore, što je u skladu s tezom da agregacija u otopini omogućuje peptidima da u kontakt s membranom dođu u funkcionalnom strukturiranom stanju [52], iako po tom pitanju postoji i suprotan stav prema kojem udruživanje povećava utrošak energije za umetanje peptida u membranu [35] [53]. Simulacije također ukazuju i na ulogu nabijenih aminokiselina te povezanost fluktuacija membrane s kreiranjem pore.

Simulacije pojedinačnih AMP-a u različitim okolišima (voda, mješavina vode i *trifluoroethanola* (TFE)) potvrđuju rezultate CD spektroskopije prema kojima peptid otopljen u vodi gubi sekundarnu strukturu, dok u mješavini voda/TFE ju u određenom postotku zadržava [54], [55]. Studije nadalje potvrđuju sklonost peptida za vezanje na membranu i poprimanje sekundarne strukture na mjestima s većom zakrivljenosti membrane u odnosu na planarne dijelove [56].

Slijedi nekoliko primjera koji ilustriraju važnost simulacijskih studija u istraživanju djelovanja antimikrobnih peptida, posebice snažnu vezu između simulacijskih i eksperimentalnih rezultata.

Važnu ulogu u borbi protiv širokog spektra patogena ima ljudski katelicidin LL-37, koji osim izravne antimikrobne aktivnosti ima i sposobnost poticanja imunološkog odgovora, zacjeljivanje rana i druge funkcije [57]. Simulacije LL-37, potvrđuju važne aspekte antibiotskog djelovanja: brže i jače vezanje te veću deformaciju modela anionske membrane uz očuvanje većeg sadržaja uzvojnice, u odnosu na model neutralne membrane [58]. Antimikrobnu ulogu imaju i različiti fragmenti tog peptida. Primjerice AMP GF-17 (17 do 32 aminokiselina od LL-37) koji se smatra glavnim antimikrobnim dijelom LL-37. MD simulacije tog fragmenta također potvrđuju CD spektrima uočeno nestrukturiranje u vodi [55] i NMR spektroskopijom utvrđenu stabilnost strukture uzvojnice u kontaktu s modelom anionske membrane [59]. Osim toga simulacije potvrđuju i NMR spektrometrijom detektirane uloge pojedinih aminokiselina, primjerice presudnu ulogu nabijenih Arg²³ i Lys²⁵ u početnom vezanju za anionsku membranu, te interakcije hidrofobnih aminokiselinskih ostataka s ugljikovodičnim lancima koje favoriziraju umetanje peptida u membranu [60] [61].

Povezanost rezultata MD simulacija i eksperimenata demonstrirali su Marrink i suradnici (2011. god.) uspoređujući interakciju cikličkog AMP BPC194 i njegovog neaktivnog linearnog analoga BPC193 s modelima anionske membrane [62]. Elektrofiziološka mjerenja struje iona kroz membranu pod različitim naponima pokazuju da samo ciklička varijanta peptida uzrokuje kreiranje pora. Isti ishod je dobiva se i u simulacijama, pri čemu radijusi nastalih pora odgovaraju onima iz eksperimenta. Osim toga, simulacije otkrivaju detalje mehanizma, paralelni položaj Lys u cikličkom peptidu (koji izostaje u linearnom analogu) je odgovoran za antimikrobnu funkciju. U simulacijama je korišteno GROMOS polje sila, a pore su uočene već nakon nekoliko desetaka do par stotina nanosekundi.

Važnost povezanosti rezultata simulacija sa eksperimentima su također istaknuli Wang i suradnici (2014. god.) ispitujući pouzdanost računalnih simulacija [63]. Analizom orijentacijskih (torzijski

i nagibni kutovi) i strukturnih (očuvanje sekundarne strukture u interakciji s membranom) fluktuacija AMP-a vezanih za membranu u različitim poljima sila uočeno je neslaganje. Naime atomski modeli koji modeliraju svaki pojedini atom (engl. *all-atom models*, AA) bolje odgovaraju eksperimentalnim rezultatima u odnosu na modele u kojima se neke funkcionalne grupe (na primjer CH_x grupe) zamjenjuju jednom česticom (engl. *united-atom models*, UA). Nadalje, obzirom je red veličine trajanja promjene položaja u odnosu na membranu i strukture peptida nekoliko mikrosekundi, zaključuje se da simulacije reda veličine mikrosekundi mogu biti samo kvalitativne, te da su dulja simulacijska vremena potrebna da bi se postiglo i kvantitativno suglasje s eksperimentalnim rezultatima. Ova studija naglašava potrebu da se simulacijske studije, uključujući polja sile, modele molekula, postavke simulacija, odabir prostorne i vremenske dimenzije sustava i slično, strogo validiraju [64].

Do sličnih zaključaka dolaze Tieleman i suradnici (2016. god.) istražujući interakciju AMP CM15 s modelom neutralne (POPC/Chol) i anionske (POPE:POPG) membrane koristeći CHARMM polje sila [65]. U simulacijama od nekoliko mikrosekundi, s jednim ili grupom od šest peptida, neočekivano izostaje formacija pore unatoč značajnim perturbacijama membrane. Daljnja analiza je pokazala da se energetska barijera za kreiranje pore znatno razlikuje (~ 40 kJ/mol) kod različitih polja sila, te je shodno tome kod nekih polja sila potrebno veće simulacijsko vrijeme za njeno opažanje. Autori uočavaju da je u većini simulacija, u kojima je relativno brzo (reda veličine nekoliko stotina nanosekundi) opaženo nastajanje pore, korišteno GROMOS polje sila, dok je dulje simulacijsko vrijeme potrebno uz CHARMM polje sila. Studija je pokazala da je potrebno validirati rezultate prvih simulacija stvaranja pore, posebice utjecaj odabranog polja sile [66] [67].

Obzirom da ostvarivanje pore zahtijeva dugo simulacijsko vrijeme, da bi se ispitale njene karakteristike i stabilnost, uobičajeno je simulacije započeti strukturama sustava koje su očekivane u nekom od koraka u mehanizmu djelovanja peptida i membrane. Na primjer peptide se u strukturi uzvojnice postavlja blizu površine membrane ili uroni u površinski dio membrane paralelno s površinom. Također početna struktura može biti sastavljena od peptida uronjenih u membranu u transmembranskoj orijentaciji. Jedan od takvih primjera su simulacije heksamera alameticina koje su pokazale formiranje bačvaste pore stabilne tijekom ~ 7 μs [68] što je u skladu s rezultatima difrakcije x-zraka na modelu membrane u prisutnosti alameticina [69]. Analogne simulacije tetramera melitina [70], te mono- i hetero- tetramera kojeg čine PGLa i analozi magainina 2 [71] pokazale su reorijentaciju peptida i kreiranje toroidalne pore, stabilne za vrijeme 5 - 9 μs. Analize udjela strukture uzvojnice i orijentacije peptida pokazale su zadovoljavajuće do jako dobro slaganje s podacima CD spektroskopije i NMR čvrstog stanja u sličnim uvjetima [72][73], ovisno o vrsti i početnoj transmembranskoj orijentaciji (paralelna/antiparalelna) peptida u tetrameru. Osim toga, simulacije su omogućile uvid u detalje interakcija između peptida te peptida i lipida koje doprinose stabilnosti strukture pore.

Simulacije makulatina (sa simulacijskim vremenom ~50 μs) otkrivaju da agregacija AMP-a prije ili nakon vezanja na membranu nije preduvjet za stvaranje pore, nego da se može stvarati sekvencijalnom oligomerizacijom oko pojedinačnog peptida koji je spontano prešao u

transmembransko stanje [74]. Pri tome peptidi koji tvore poru mogu graditi multimerne (3-8 peptida) različitih oblika, propusnosti i trajanja. Nadalje, simulacijske studije otkrivaju da postojanje pora nije preduvjet za antimikrobno djelovanje, na primjer simulacijska studija, s vremenima reda veličine 10 mikrosekundi, PGLa na višim temperaturama (120 °C – 160 °C) pokazuje da peptidi spontano jedan po jedan mogu proći kroz membranu bez stvaranja pore [66]. Da pora ne mora biti ključna za antimikrobno djelovanje opaženo je i eksperimentalno kod drugih vrsta peptida [75], [76], [77].

Međutim, i uz velik broj studija detalji mehanizma djelovanja AMP-a, posebno oni koji se odnose na prijelaz iz stanja u kojem su peptidi vezani na membranu u stanje s deformacijama u membrani, i dalje ostaje uglavnom nepoznat. U studiji Liua i suradnika (2018. god.) interakcije melitina i membrane, u modelu krupnog zrna, sugerirano je da, kod visokih P/L omjera, nakon početnog vezanja peptida za membranu, ne slijedi direktno umetanje peptida u membranu, već je uočen međukorak koji uključuje znatno lokalno mijenjanje morfologije membrane u obliku sferičnih ispupčenja u gornjem dijelu lipidnog dvosloja, promjera reda veličine debljine membrane (~0.005 μm), u dijelu membrane koji ima velik broj peptida vezan [78]. Moguće je da ovakva ispupčenja mogu dovesti i do potpune ekstrakcije lipida iz gornjeg sloja membrane.

Deformacije poput opisanih, iako dimenzija puno većih od onih u simulacijama (~1 μm), uočene su konfokalnim mikroskopom, nakon dodavanja melitina koncentracija većih od 0.7 μM, na neutralne vezikule [78]. Iako u navedenim simulacijama, u vremenu ~20 μs, nije došlo do kreiranja same pore, niti se dogodila potpuna ekstrakcija lipida, autori predlažu da se na taj način stvara asimetrija u membrani, a posljedično i mijenjaju njena mehanička svojstva, što doprinosi snižavanju energetske barijere i olakšava nastanak defekata, odnosno stvaranje pore. Preduvjet za ovakvo djelovanje je veliki P/L omjer, odnosno visoka lokalna koncentracija peptida vezanih na membranu. Slična ispupčenja opisana su i u recentnim MD simulacijama krupnozrnatih modela temporina B i L [79], gomezina [80], te simulacijama magainina 2 [81].

1.3 Cilj istraživanja

Istražuju se tri vrste antimikrobnih peptida:

- 1) **Adepantin-1** – iz skupine *adepantina*, prvih AMP-ova umjetno dizajniranih alatom *Designer*. Ima strukturu uzvojnice i izrazito visoku selektivnost prema Gram-negativnim bakterijama, nešto manju prema Gram-pozitivnim, i vrlo malu toksičnost prema ljudskim stanicama, zbog čega ima izrazito veliki SI indeks. Adepantin-1 manje je od 50% homologan bilo kojem drugom prirodnom ili sintetskom AMP-u [11] [82].
- 2) **Kiadini** - AMP umjetno dizajnirani QSAR metodama. Kiadini -1, -2 i -3 dobiveni su zamjenama Val → Gly u dvostrukoj sekvenci PGLa-H, dok su kiadini -4, -5 i -6 umjetno dizajnirani pomoću *Designer* algoritma [11]. Također imaju strukturu uzvojnice, bogati su glicinom i imaju različite selektivnosti prema bakterijama odnosno eukariotskim stanicama.

- 3) **Anisaxin-2S** – iz skupine *anisaxina*, AMP-ova identificiranih iz morskih parazita iz roda *Anisakis* [83]. Ima strukturu uzvojnice i pokazuje jako dobru aktivnost prema Gram-negativnim bakterijama, nešto manju prema Gram-pozitivnim, uključujući i sojeve koji su razvili otpornost na klasične antibiotike, te vrlo malu toksičnost prema ljudskim stanicama.

Zanimaju nas karakteristična svojstva koja definiraju interakciju ovih klasa peptida s modelima neutralnih i anionskih membrana (opisane u **odjeljku 1.4**), kako bismo predložili detalje mehanizma antimikrobnog djelovanja. Između ostalog raspraviti ćemo da li mehanizam djelovanja antimikrobnih peptida može uključiti ekstrakciju lipida.

Osnovne hipoteze:

- 1) Simulacije interakcije antimikrobnih peptida s modelima plazma membrana Gram-pozitivnih, unutarnjih i vanjskih membrana Gram-negativnih bakterija, te neutralnih membrana eukariota, ukazuju na moguće različite mehanizme djelovanja i naglašavaju svojstva, npr. realizacija sekundarne strukture, fleksibilnost, udruživanje u klastere, važna za antimikrobno i toksično djelovanje.
- 2) Asocijacije AMP-ova mogu pomoći postavljanju peptida u položaj i konformaciju povoljnu za umetanje u membranu.
- 3) Položaj i broj aminokiselina Gly u aminokiselinskom slijedu mijenja svojstva peptida i utječe na interakciju s membranom.
- 4) Mehanizam djelovanja AMP-a može uključivati ekstrakciju lipida ostvarenu uz velike lokalne koncentracije peptida na površini membrane.

1.4 Metodologija

U ovom radu istražuju se međudjelovanja i karakteristike sustava koji sadrži antimikrobne peptide, membranu i otapalo, simulacijskim metodama molekulske dinamike (MD) [84] [85]. Vremenskim usrednjenjem veličina izračunatih tijekom simulacija određuju se svojstva sustava koja se potom mogu usporediti s eksperimentalnim vrijednostima.

U MD metodi zanemaruje se subatomska struktura atoma, te se atomi ili grupe atoma tretiraju kao kuglice određene mase, spojene elastičnim štapovima koji odgovaraju kovalentnim vezama, dok je dinamika sustava opisana zakonima klasične fizike. U središtu metode je empirijska funkcija $U(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N)$ koja predstavlja ukupnu potencijalnu energiju N čestica u sustavu koje se nalaze na položajima $\mathbf{r}_i = (x_i, y_i, z_i)$. Funkcija potencijalne energije tipično se sastoji od “veznih” članova koji aproksimativno opisuju interakcije između kovalentno povezanih čestica (rastezanje veze, promjena kuta između kovalentno povezanih atoma, torzija) i “neveznih” članova koji opisuju elektrostatske i van der Waalsove interakcije [86]:

$$U = U_{veza} + U_{kut} + U_{torzija} + U_{ES} + U_{vdW}$$

$$\begin{aligned}
U(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = & \sum_{i,j \in S_V} \frac{a_i}{2} (r_{ij} - r_{ij0})^2 + \sum_{i,j,k \in S_{VK}} \frac{b_i}{2} (\theta_{ijk} - \theta_{ijk0})^2 \\
& + \sum_{i,j,k,l \in S_{TK}} \frac{c_i}{2} [1 + \cos(n\omega_{ijkl} - \gamma_{ijkl0})] + \sum_{i,j \in S_N} 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \\
& + \sum_{i,j \in S_N} k \frac{q_i q_j}{r_{ij}}
\end{aligned}$$

U gornjem izrazu S_V, S_{VK}, S_{TK} i S_N označavaju skupove svih kovalentnih veza, kutova između kovalentno povezanih atoma, sve torzije i sve nevezne parove respektivno. $r_{ij} = |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|$ predstavlja udaljenost između čestica i i j , a θ_{ijk} kut između tri kovalentno povezane čestice u nizu. Konstante a_i i b_i su odgovarajuće konstante harmonijskih sila, r_{ij0} i θ_{ijk0} ravnotežne vrijednosti. ω je kut torzije, c_i maksimum torzijskog energetskog doprinosa, n broj minimuma energije prilikom rotacije za 360° , a γ fazni pomak torzije. ε_{ij} predstavlja minimum vrijednosti U_{vdW} koja se postiže na udaljenosti σ_{ij} , dok je q parcijalni naboj čestice, a k Coulombova konstanta,

Opisani parametri međučestičnih interakcija podešavaju se eksperimentalno na različite načine što daje različite funkcije potencijalne energije, za koje se još koristi i naziv polje sila. Postoji više polja sila: CHARMM, GROMOS, OPLS, AMBER, MARTINI, itd. Razlikuju se ne samo u tipovima čestica i parametrima, nego i u funkcionalnoj formi. Tako npr. polja sila GROMOS¹, CHARMM i MARTINI sadrže dodatni član koji opisuje energije savijanja izvan ravnine (neprava torzija, engl. *improper dihedrals torsion*) [87]:

$$U_{neprava\ torzija} = \sum_{i,j,k,l} \frac{d_i}{2} (\omega_{ijkl} - \omega_{ijkl0})^2$$

dok polje sile CHARMM uz nepravu torziju sadrži i doprinos savijanja kuta između tri nevezane čestice (Urey-Bradley potential)[42]:

$$U_{U-B} = \sum_{i,j,k} \frac{e_i}{2} (\theta_{ijk} - \theta_{ijk0})^2$$

Uz poznatu funkciju potencijalne energije, može se odrediti sila na i – ti atom:

$$\mathbf{F}_i = -\nabla_{\mathbf{r}_i} U(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N)$$

Rezultati simulacija su vremenski ovisne konfiguracije sistema koje se dobiju numeričkom integracijom Newtonovih jednadžbi gibanja

¹ U novijim verzijama polja sila GROMOS (od verzije 43A1) radi efikasnijeg računanja koristi se $U_{veza} = \sum_{i,j \in S_V} \frac{a_i}{4} (r_{ij}^2 - r_{ij0}^2)^2$ [174].

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

gdje je $\mathbf{r}_i(t) = (x_i(t), y_i(t), z_i(t))$ vektor položaja i -te čestice, m_i – njena masa, a $\mathbf{F}_i(t)$ sila na i -tu česticu u trenutku t . Odgovarajuće brzine čestica $\mathbf{v}_i(t)$ određuju njihove kinetičke energije i temperaturu sistema.

Jednadžbe gibanja se rješavaju numerički primjerice pomoću *leap-frog* ili *velocity Verlet* algoritma. *Leap-frog* algoritam je zadani integrator u Gromacsu koji koristi položaje $\mathbf{r}_i(t)$ i brzine $\mathbf{v}_i(t - \frac{1}{2}\Delta t)$ da bi se odredili položaji i brzine nakon vremenskog koraka Δt na sljedeći način:

$$\mathbf{v}_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \mathbf{v}_i\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m} \cdot \mathbf{F}_i(t)$$

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \Delta t \cdot \mathbf{v}_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right)$$

Vremenski korak Δt mora biti dovoljno malen u usporedbi s periodom najbržih vibracija. Kako je period rastezanja veze reda veličine 10 fs, a ostalih interakcija 40 fs, to se koriste različiti algoritmi (primjerice LINCS [88], SHAKE [89]) kojima se zamrzavaju neki stupnjevi slobode, najčešće vibracije veze vodika s težim atomom, što omogućuje korištenje tipičnog vremenskog koraka $\Delta t = 2$ fs u atomističkim i $\Delta t = 20$ fs u krupnozrnatim simulacijama.

U ovom radu koriste se tri polja sila: CHARMM36m [42][90] polje sila za atomske modele, GROMOS polje sila [87] [91] za simulacije u kojima su atomi ugljika s kovalentno vezanim vodicima tretiraju kao jedna čestica i MARTINI 2.2 polje sila [92] za modele krupnog zrna (engl. *coarse grained*, CG) u kojima se reducira kompleksnost sustava tako što se grupe od prosječno četiri teška atoma zajedno s pripadajućim vodicima tretiraju kao jedan interakcijski centar (tj. jedna čestica, engl. *bead*) mase 72 amu (egl. *atomic mass unit*) smješten u centar mase grupe atoma koje reprezentira. U MARTINI 2.2 polju sila čestice su podijeljene u četiri osnovna tipa: polarne (P , neutralna grupa atoma koja se lako razgrađuje u vodi), apolarne (C , hidrofobne grupe atoma), nepolarne (N , grupe atoma koje su djelomično polarne a djelomično apolarne) i one koje nose elektrostatski naboj (Q). Tipovi N i Q se nadalje dijele prema sposobnosti vezanja vodika (d - donor vodika, a - akceptor vodika, da - donor-ili-akceptor vodika i o - one koje ne vežu vodik), dok se tipovi P i C dijele prema stupnju polarizacije (od 1 do 5), što rezultira s ukupno 18 standardnih podtipova. Ukoliko molekula sadrži prstenastu strukturu, tri teška atoma s pripadajućim vodicima se tretiraju kao jedna čestica mase 45 amu, kojoj se onda uz oznaku standardnog tipa dodaje oznaka S . U proteinima se u nekim slučajevima, da bi se izbjegle steričke smetnje, bočni lanci aminokiselina tretiraju kao poseban podtip, te se uz oznaku standardnog tipa dodaje oznaka A . Konstante sila u MARTINI polju sila općenito su male kako bi gibanje krupnozrnatih interakcijskih centara bilo fleksibilnije i bolje oponašalo gibanja u atomističkim modelima.

Za generiranje trajektorija u ovom radu koristi se simulacijski paket GROMACS [93]. Dobivene trajektorije analizira se pomoću računalnih alata kako bi se pratilo ponašanje sustava, te izračunala strukturna i termodinamička svojstva. Kreiranje početnih struktura sustava izvršava se pomoću sljedećih računalnih alata: C-Quark <https://zhanggroup.org/C-QUARK/> [94], CHARMM-GUI <https://www.charmm-gui.org/> [95], Memgen <http://memgen.uni-goettingen.de/> [96], GROMACS [93]. Simulacije se odvijaju na superračunalu Bura sa Sveučilišta u Rijeci <https://cnrm.uniri.hr/hr/bura/>. Za analizu rezultata koriste se sljedeći računalni alati: GROMACS [93], APL@Voro [97], Fatslim [98], za vizualizaciju struktura programski paket VMD [99], *Gnuplot* (<http://www.gnuplot.info/>) za izradu grafova i *GIMP* (<https://www.gimp.org/>) za grafičku obradu slika.

Unutarnje membrane Gram-negativnih bakterija predstavljaju se anionskim dvoslojem sačinjenim od lipida POPE (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*) i POPG (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-glycerol*) u omjeru 3:1 u oba sloja [100]. Model Gram-pozitivne plazma membrane je anionski dvosloj sačinjen od lipida POPG, LPG (*lysylphosphatidylglycerol*) i PVCL2 (*kardiolipin*) u omjeru 57:38:5 u oba sloja [101]. Za modele eukariotskih membrana koriste se neutralni jednokomponentni lipidni dvosloji od POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine*) ili DLPC (*1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine*) lipida [102]. Model vanjske membrane Gram-negativnih bakterija opisan je u **odjeljku 2.1.2.**

Svi peptidi korišteni u simulacijama su amidirani na C kraju (peptid-NH₂). Posttranslacijska modifikacija u vidu dodavanja amidne skupine na C kraju peptida uobičajena je u prirodi [103], doprinosi njihovoj većoj stabilnosti i boljem antimikrobnom djelovanju [104], te su takvi sintetizirani i korišteni u odgovarajućim eksperimentima na koje se upućuje u tekstu (adepantin1 [11], kiadini [54], anisaxin-2S [83]).

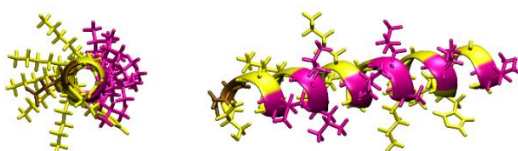
Simulacijski sustavi su pravilni kubični sa bridovima duljine 10-20 nm i 250-800 lipida, a vremena simulacija su veličine mikrosekunde za atomističke (AA) i *united-atom* (UA), odnosno nekoliko desetaka mikrosekundi za krupnozrnate (CG) simulacije.

2 MATERIJALI I METODE

2.1 Adepantin-1

2.1.1 Dizajn i biološka aktivnost

Adepantin-1 ($\text{GIGKHHVGKALKGLKGLLKGLGES-NH}_2$)² (sl. 3) jedan je od sedam peptida nazvanih „adepantini“ (Automatically Designed Peptide Antibiotics), umjetno dizajniranih pomoću *AMP-Designer* algoritma [11], [82]. Algoritam je razvijen pomoću baze podataka AMPad [11] koja sadrži podatke o indeksu selektivnosti (SI) prema *E. coli* za 73 antimikrobna peptida u obliku uzvojnice, izolirana iz kože žaba i/ili njihovih sintetskih analoga. *Designer* koristi D-deskriptor, koji je kosinus kuta između dvaju sekventnih momenata dobivenih s različitim ljestvicama hidrofobnosti, indeks selektivnosti aminokiselina, indeks pravilnosti motiva i drugih statističkih pravila izdvojenih iz baze podataka AMPad za identifikaciju visoko selektivnih peptidnih antibiotika.

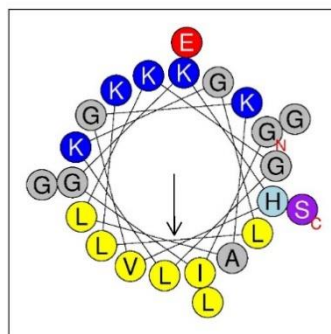


Slika 3 Početna struktura adepantina-1 kako predviđa C-QUARK ima jaku amfipatsku distribuciju hidrofobnih (magenta) i hidrofilnih (žutih) ostataka [94]

Adepantin-1 ima sedam glicina od ukupno dvadeset i tri amino kiseline, od kojih je većina u polarnom sektoru (sl. 4). Njihova funkcija može biti dvostruka u smislu da dopuštaju nestrukturiranim monomerima da lako prolaze kroz komponente stanične stijenke i da povećavaju vjerojatnost prolazne agregacije monomera i stvaranja pora u citoplazmatskoj membrani [105]. Adepantin-1 također sadrži negativno nabijenu glutaminsku kiselinu, a pretpostavlja se da negativno nabijeni ostaci Asp/Glu, koji su prisutni u više od 70% nativnih amfipatskih kationskih peptida, utječu na strukturu i dimerizaciju peptida, kao i da inhibiraju hemolizu [106], [107].

Ova povoljna svojstva ugrađena u dizajn adepantina-1 rezultiraju izvrsnim antimikrobnim djelovanjem. Prethodno testiranje objavljeno u [11] i [82] pokazalo je da je adepantin-1 jako selektivan za Gram-negativne bakterije, s vrijednostima MIC od 2-4 μM protiv *E. coli* i 16 μM protiv *P. aeruginosa*, ali preko 128 μM protiv *S. aureusa*, te izrazito niskom hemolitičkom aktivnosti ($\text{HC}_{50} = 480 \pm 60 \mu\text{M}$), što rezultira vrlo visokim indeksom selektivnosti $\text{SI}_{E.coli} = \text{HC}_{50}/\text{MIC}_{E.coli} = 190 \pm 80$, pogotovo u usporedbi s drugim prirodnim AMP-ovima (PGLa 105, Ascaphin-1 67, Magainin-2 20, Pseudin-2 18, Melitin 0.5, AMPad baza [11])

² U svim simulacijama u ovom radu peptidi su amidirani na C kraju (vidi **odjeljak 1.4**)



Hidrofobnost (H)	Polarni ostaci + Gly (n/%)	Nepolarni ostaci (n/%)
0.275	15 / 65.22	8 / 34.78
2D hidrofobni moment (μH)	Nenabijeni ostaci + Gly	Aromatični ostaci
0.596	His 1, Ser 1, Gly 7	-
Ukupni naboj	Nabijeni ostaci	Posebni ostaci
+4	Lys 5, Glu 1,	Cys 0, Pro 0
Hidrofobni sektor: LLVLLILAL Polarni sektor: G G K G K K K E G K G G G H S		

Slika 4 Svojstva adeptantina-1, rezultati *HeliQuest* mrežnog kalkulatora [108] (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/> pristup u rujnu 2022.). Ulazni podatak je primarna sekvenca adeptantina-1, a rezultati su: srednja hidrofobnost po aminokiselinskom ostatku (H), srednji 2D hidrofobni moment (amfipatičnost) po aminokiselinskom ostatku (μH) [109] i druga svojstva peptida. Za proračun hidrofobnih svojstava korištena je Fauchèreova ljestvica [110] s vrijednostima srednje hidrofobnosti u intervalu [-1.01, 2.25] i srednjeg 2D hidrofobnog momenta u intervalu [0, 3.26] (iznos vektora prikazanog na slici). Hidrofobni ostaci su obojeni žutom bojom, polarni-nabijeni plavom (+) i crvenom (-), polarni-neutralni nijansama ljubičaste te glicini i alanini sivom bojom.

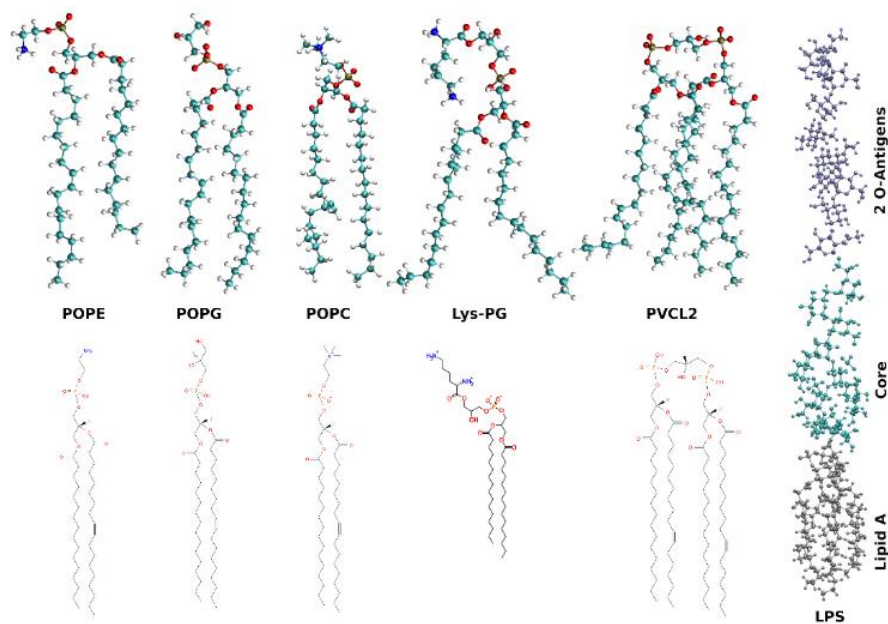
Mjerenje spektra cirkularnog dikroizma (CD) [82] pokazuje da adeptantin-1 nema strukturu uzvojnice u vodenom puferu (izračunati udio je manji od 5%), ali tvori strukturu uzvojnice u prisutnosti organskih otapala kao što je 50% trifluoroetanol (TFE) (sa udjelom uzvojnice od 35%). Za razliku od tih okruženja, u prisutnosti anionskih velikih unilamelarnih vezikula (LUV, engl. *large unilamellar vesicle*), oblik CD spektra, posebno omjer elipticiteta $\theta_{222} : \theta_{208} > 1$, sugerira mogućnost da peptidi interagiraju s tim membranama udruženi i u obliku uzvojnice [111] (s udjelom uzvojnice od 55%) što se posebno uočava u spektrima kovalentno povezanih dimera adeptantina -2 i -3 ($[\text{ADP-2}]_2$ i $[\text{ADP-3}]_2$) [82]. U prisutnosti neutralnih LUV-ova, i monomerni i dimerni peptidi ostali su uglavnom razmotani, što ukazuje da se nisu umetnuli u ovu vrstu membrane. Eksperimenti u kojima se istraživala permeabilizacija vanjske i citoplazmatske membrane *E. coli* ukazuju da dimeri adeptantina -2 i -3 brže i efikasnije narušavaju integritet membrane u odnosu na monomere adeptantina. Stoga se čini da dimerizacija adeptantina pogoduje permeabilizaciji vanjske i citoplazmatske membrane [82]. Koncentracija lipida u gore opisanim mjerenjima s kojima će se vršiti usporedbe je 400 $\mu\text{M/l}$, a peptida 20 $\mu\text{M/l}$ [82], što rezultira omjerom P/L od 1/20, odnosno jedan peptid na 20 lipida.

2.1.2 Simulacije

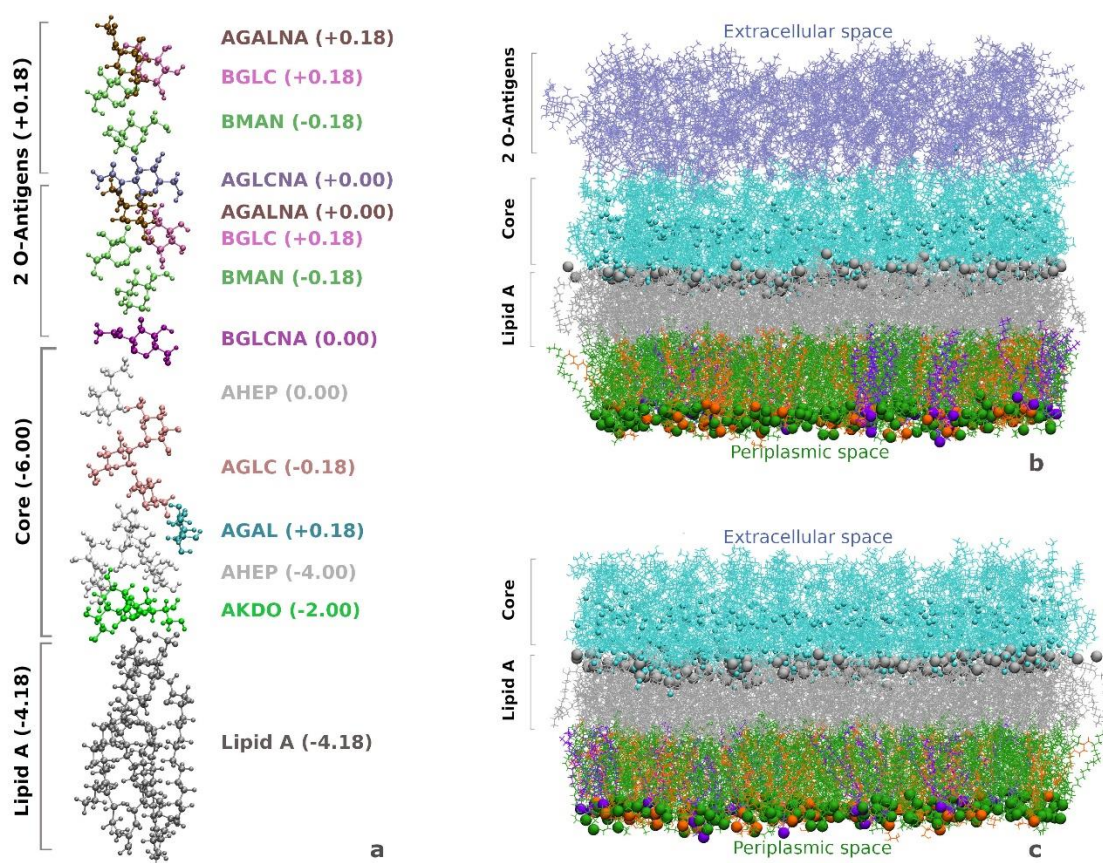
Atomističke i krupnozrnate MD simulacije adepantina-1 provedene su pomoću programa Gromacs 2021.3 [93]. Simulacijski sustavi sastoje se od jednog ili više adepantina-1 uronjenih u vodu u blizini različitih membranskih modela. Podaci o simulacijama (trajanje, broj peptida i sastav membranskih modela) sažeto su prikazani u **tablici 1**, a početne dimenzije simulacijskih sustava u **tablici 9** u Prilozima.

AA simulacije uključivale su slučajeve s jednim, dva ili dvanaest peptida adepantina-1, s različitim trajanjem, između 0.5 i 1.6 μ s. U njima su korišteni sljedeći modeli membrana (**sl. 5**):

- 1) **Model unutarnje membrane Gram-negativnih bakterija** sastoji se od negativno nabijenog dvosloja sačinjenog od POPE i POPG lipida u omjeru miješanja 3:1 [100].
- 2) **Model Gram-pozitivne plazma membrane** sastoji se od negativno nabijenog dvosloja sačinjenog od POPG, Lys-PG i PVCL2 lipida u omjeru miješanja 57:38:5 [101].
- 3) **Eukariotske stanice** modelirane su neutralnim POPC lipidnim dvoslojem [58].
- 4) **Model vanjske membrane *E. coli***: Unutarnji sloj sadrži zwitterionski *1-palmitoyl-2-cis-vaccenic-phosphatidylethanolamin* (PVPE) (74%), te anionske *1-palmitoyl-2-cis-vaccenic-phosphatidylglycerol* (PVPG) (21%) i PVCL2 (5%) [112]. Vanjski sloj čine anionske (naboj -10) molekule lipopolisaharida (LPS). LPS molekule sastoje se od lipida A (Tip 1 sa 6 acilnih lanaca), jezgre (K12) na koje su vezana 2 O-antigena (glatka membrana, **sl. 6b**) ili bez O-antigena (hrapava membrana, **sl. 6c**) [113]. Detaljna struktura LPS molekula s nabojima pojedinih dijelova prikazana je na **sl. 6a**. Okoliš jezgre sadrži neutralizirajuće ione Ca^{2+} , dok su O-antigeni neutralizirani ionima iz otopine [114].



Slika 5 Molekule lipida i lipopolisaharida (LPS) korištene u simulacijama iz CHARMM-GUI baze podataka [115], [116], [117]. Više detalja o LPS-u prikazano je na **sl. 6**.



Slika 6 Struktura molekula lipopolisaharida (LPS) i naboji pojedinih dijelova u polju sile CHARMM [116], nazivi dijelova molekule odgovaraju CHARMM-GUI nomenklaturi [117] (a). Vanjska membrana *E. coli*, glatka (b), hrapava (c). PVPE lipidi su zeleni, PVPG lipidi su narančasti, PVCL2 je ljubičast, a lipid A je siv, svi su predstavljeni linijama sa izdvojenim P atomima koji su prikazani kuglicama. Područje jezgre LPS-a predstavljeno je tirkiznom bojom, neutralizirajući Ca^{2+} ioni u području jezgre predstavljeni su tirkiznim kuglicama, a 2 O-antigena predstavljena su ljubičastim linijama.

Tablica 1 Sažetak MD simulacija adepantina-1 sa različitim modelima membrana

Oznaka simulacije	Broj peptida	Omjer P/L	Gram -		POPC		Gram +		Gram- vanjska membrana		
			Vrijeme (μs)	Sastav membrane	Vrijeme (μs)	Sastav membrane	Vrijeme (μs)	Sastav membrane	2 O-Antigena Vrijeme(μs)	0 O-Antigena Vrijeme(μs)	Sastav membrane
AA-0	0	0/256	0.5		-		0.5		0.5	0.5	
AA-1a *	1	1/256	1	192 POPE	0.5	256 POPC	1	146 POPG	0.5	0.1	Gornji sloj: 50 LPS
AA-1b *	1	1/256	1.6	64 POPG	-		1.6	96 Lys-PG	-	-	Donji sloj: 105 PVPE
AA-2	2	1/128	1.5		-		1.5	14 PVCL2	-	-	
AA-12a *	12	1/43	1	384 POPE	0.5	512 POPC	1	292 POPG	-	0.1	30 PVPG
AA-12b *	12	1/43	1	128 POPG	0.5		1	192 Lys-PG 28 PVCL2	0.4	0.2	8 PVCL2
CG-12	12	1/43	25								
CG-24	24	1/21	42.5	384 POPE							
CG2AA-12 **	12	1/43	0.5	128 POPG							
CG2AA-24 **	24	1/21	0.5								

* Simulacije sustava s istim početnim konfiguracijama označene su slovima **a** (case1) i **b** (case2).

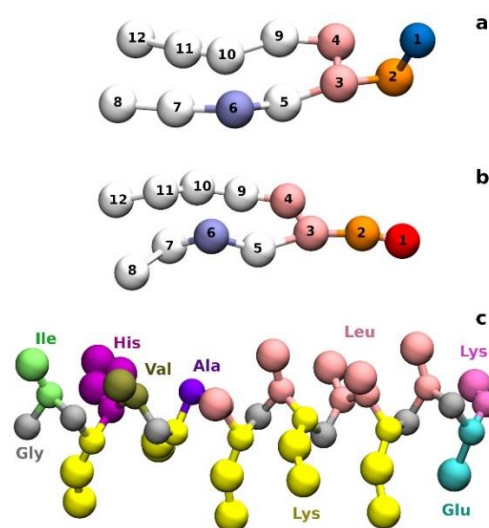
** Zadnja konfiguracija u CG simulaciji transformirana je u atomistički model, a simulacija nastavljena kao AA MD.

CG simulacije izvedene su sa dvanaest ili dvadeset i četiri peptida adeptantina-1 u interakciji s modelom unutarnje membrane Gram-negativnih bakterija (POPE:POPG u omjeru 3:1). Trajanja CG simulacija iznosila su 25 μ s za slučaj sa dvanaest peptida i 42.5 μ s za slučaj sa dvadeset i četiri peptida (vidi **tablicu 1**).

Konačna stanja CG simulacija transformirana su u atomistički model (**sl. 29**) te je simulacija nastavljena kao AA sistem (oznaka CG2AA u **tablici 1**) kako bi se dobili bolji uvidi u detalje interakcije peptida s membranom. Postupak transformacije CG u AA, poznat i kao *backmapping*, napravljen je pomoću CHARMM-GUI *Martini to All-atom Converter-a* [118]. Postupak je uključivao korištenje python skripte *backward.py* za konverziju peptida [119]. Kako CG Martini lipidi imaju odgovarajuće AA lipide u polju sile CHARMM36m, kao i iste naboje, nisu bili potrebni dodatni ioni.

Br.	AK	BB	SC1	SC2	SC3
1	Gly	Qd			
2	Ile	Nd	AC1		
3	Gly	Nd			
4	Lys	Nd	C3		
5	His	Nd	SC4	SP1	SP1
6	Val	N0	AC2		
7	Gly	N0			
8	Lys	N0	C3	Qd	
9	Ala	C5			
10	Leu	N0	AC1		
11	Lys	N0	C3	Qd	
12	Gly	N0			
13	Leu	N0	AC1		
14	Lys	N0	C3	Qd	
15	Gly	N0			
16	Leu	N0	AC1		
17	Leu	N0	AC1		
18	Lys	N0	C3	Qd	
19	Gly	Na			
20	Leu	Na	AC1		
21	Gly	Na			
22	Glu	Na	Qa		
23	Ser	P5	P1		

Br.	POPE	POPG
1	Qd	P4
2	Qa	Qa
3	Na	Na
4	Na	Na
5	C1	C1
6	C3	C3
7	C1	C1
8	C1	C1
9	C1	C1
10	C1	C1
11	C1	C1
12	C1	C1



Slika 7 Tipovi i ilustracije interakcijskih centara adeptantina-1 (c), POPE (a) i POPG (b) lipida u CG simulacijama. AK – aminokiselina, BB – tip čestice koja zamjenjuje atome iz okosnice (engl. *backbone*), SCx – tipovi čestica koje zamjenjuju atome iz bočnih lanaca (engl. *side chain*) aminokiselina.

Početne strukture adeptantina-1 dobivene su pomoću C-QUARK mrežne aplikacije (<https://zhanggroup.org/C-QUARK/> pristup u siječnju 2022.) [94]. Predviđanje je dalo 5 modela: model 1 sa strukturom α -uzvojnice i najvišom pouzdanosti (procijenjeni TM rezultat = 0.376 ± 0.149) koji je korišten kao početna struktura u simulacijama i druge modele 2-5 sa strukturom α -uzvojnice i prijelomom u blizini Leu¹³.

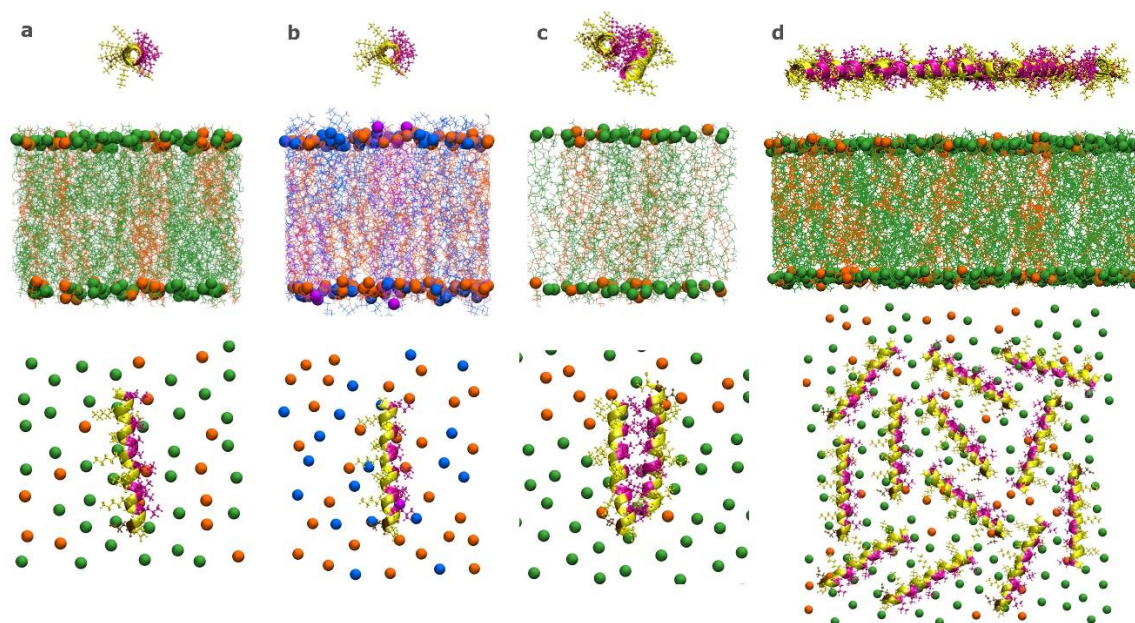
Modeli za lipide i lipopolisaharide (**sl. 5**) preuzeti su iz baze podataka CHARMM-GUI [117]. Polje sile CHARMM36m [90] i model vode TIP3 [120] korišteni su u AA simulacijama, a Martini 2.2

polje sile za CG modele [92]. Početne konformacije za AA simulacije pripremljene su pomoću CHARMM-GUI (<https://www.charmm-gui.org/> pristup u siječnju 2022.) *Membrane Buildera* [115] [116], dok su početne konformacije za CG simulacije kreirane pomoću CHARMM-GUI *Martini Bilayer Makera* [121] [122].

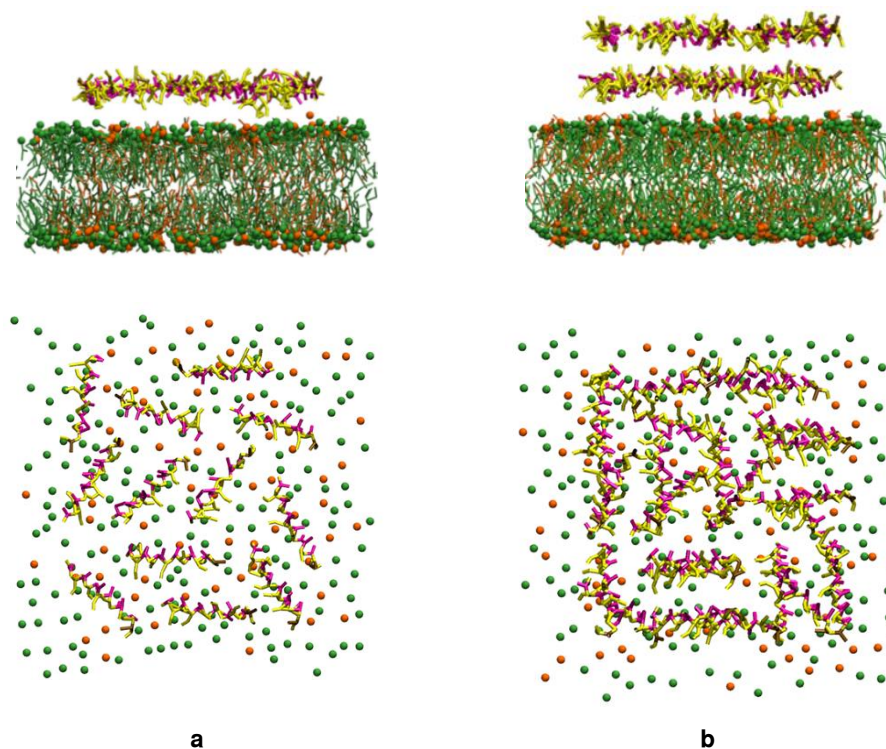
Ukupni naboj peptida od +5 definiran je na pH 7, uzimajući u obzir nabijeni N-terminal i neutralni amidirani C-kraj te neutralni histidin. *Martini Bilayer Maker* nema mogućnost izbora različito nabijenih završetaka pojedinačnog peptida, pa smo pri konstrukciji početnih struktura za CG simulacije najprije odabrali da oba terminala budu nabijena, a zatim u svakom peptidu manualno uklonili naboj na C-terminalu zamjenom Qa kuglice za P5 kuglicu [123] (vidi **odjeljak 9.1.1 III** u Prilozima).

Iznad i ispod membrane dodan je vodeni sloj debljine najmanje 4 nm, što je rezultiralo s ~100 molekula vode po lipidu u AA simulacijama i ~25 molekula vode po lipidu u CG simulacijama. Sustavi su neutralizirani s K^+ i Cl^- ionima u koncentraciji od 0.15 M uz dodatak neutralizirajućih Ca^{2+} kationa u području jezgre LPS-a u slučaju simulacija Gram-negativne vanjske membrane.

Peptidi su inicijalno postavljeni u otopinu u ravnini paralelnoj s površinom membrane i ~2 nm iznad nje, s hidrofilnom i hidrofobnom stranom jednako udaljenom od površine membrane (**sl. 8**). Za slučaj AA-2, dva vezana peptida iz simulacija AA-12b uzeti su za početnu strukturu. U CG-24 simulaciji, peptidi su inicijalno raspoređeni u dvije paralelne ravnine udaljene jedna od druge ~2 nm (**sl. 9**). Dva slučaja (a i b) za AA-1 i AA-12 međusobno su se razlikovala po početnoj orijentaciji odnosno rasporedu peptida. Detalji o kreiranju početnih struktura za simulacije adepantina-1 nalaze se u **odjeljku 9.1.1** u Prilozima.



Slika 8 Početne konfiguracije (pogled sa strane i odozgo) u nekim AA simulacijama. AA-1b sa POPE:POPG membranom (**a**), AA-1b sa Gram+ membranom (**b**), AA-2 (**c**), AA-12b sa POPE:POPG membranom (**d**). Peptidi su prikazani kao uzvojnice, s aminokiselinskim ostacima kao kuglicama, magenta za hidrofobne i žuta za hidrofilne ostatke. Membrane su predstavljene kuglicama atoma P zelene boje za POPE lipide, narančaste za POPG, plavo za Lys-PG, ljubičasto za PVCL2 lipide. Ostali atomi i molekule membrana, kao i molekule vode i iona nisu prikazani radi preglednosti.



Slika 9 Početne konfiguracije (pogled sa strane i odozgo) u CG simulacijama. **a** - slučaj s dvanaest peptida i **b** - slučaj s dvadeset i četiri peptida. Peptidi su prikazani kao štapići, magenta za hidrofobne i žuta za hidrofilne ostatke. Membrana je predstavljena kuglicama atoma P zelene boje za POPE lipide i narančaste za POPG lipide. Ostali atomi i molekule membrana, kao i molekule vode i iona nisu prikazani radi preglednosti.

Ekvilibracija je napravljena u šest koraka, prema preporukama CHARMM-GUI [117]. Za prva dva koraka korištena je izotermno-izohorna (NVT), a za ostala četiri koraka izotermno-izobarna (NpT) dinamika (konstantni tlak i temperatura). U svim koracima je korišten Berendsenov termostat i barostat. Temperatura je bila fiksirana za vrijeme ekvilibracije i produkcije na 310 K. Tijekom ekvilibracije primijenjena su različita ograničenja na dijelove sustava: ograničenja promjene položaja teških atoma kako se početna struktura peptida ne bi značajnije promijenila, ograničenja vertikalnog gibanja P atoma lipida kako bi se zadržali u ravnini površine membrane i ograničenja na veće promjene dihedralnih kutova kako bi se spriječile značajnije strukturne promjene tijekom ekvilibracije. Te ograničavajuće sile su se postupno smanjivale u svakom novom koraku ekvilibracije [117] (vidi **tablicu 10** u Prilozima).

Uvjeti NpT ansambla u simulaciji zadani su Nose-Hooverovim termostatom i Parrinello-Rahmanovim barostatom, s vremenskom konstantom od 1.0 ps za temperaturu i 5.0 ps za tlak, uz kompresibilnost od $4.5 \cdot 10^{-5}$ bara [124], [125]. Korišten je *Leap-frog* integrator s vremenskim korakom od 2 fs, a veze među atomima održavane su LINCS algoritmom [88]. Za proračun elektrostatskih interakcija korištena je Particle-Mesh-Ewald (PME) metoda [126] s graničnim radijusom za elektrostatski doprinos od 1.2 nm. Van der Waalsove sile ograničene su tako da za udaljenosti veće od 1.2 nm one iznose nula, pri čemu nakon 1.0 nm počinje njihovo smanjenje.

Gromacs alati *clustsize*, *traj*, *density* i *sasa* korišteni su za analizu udruživanja peptida, udaljenosti hidrofobnih/hidrofilnih ostataka od središta membrane, profila gustoće duž normale membrane i

površine peptida dostupne otapalu, dok je sekundarna struktura određena *DSSP* alatom [127], [128]. Program *APL@Voro*, koji se temelji na Voronaijevoj particiji površine lipida za odabrane ključne atome u glavama lipida, korišten je za izračunavanje debljine membrane i površine po lipidu (area per lipid, APL) [97]. Za određivanje parametara reda lipidnih acilnih lanaca korišten je Gromacsov *order* alat.

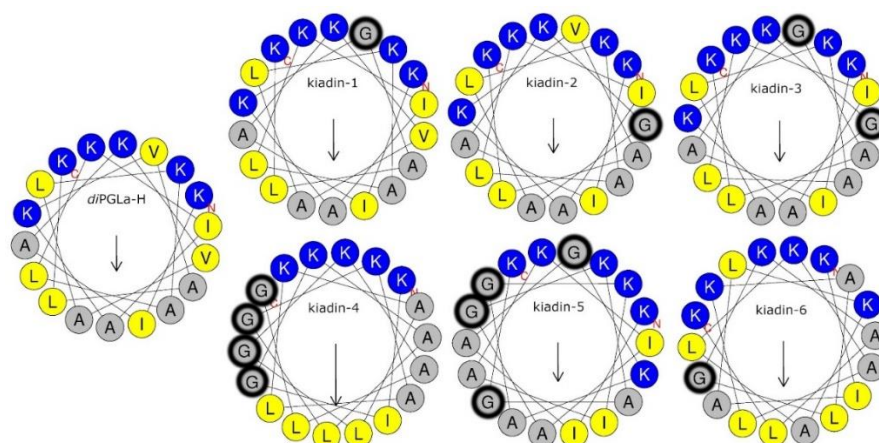
Amfipatičnost peptida opisana je srednjim 2D hidrofobnim momentom po aminokiselinskom ostatku koji za adepantin-1 iznosi 0.596 (moguće vrijednosti nalaze se u intervalu [0, 3.26]), a određen je pomoću mrežnog alata *HeliQuest* [108] (sl. 4) koji koristi projekciju savršene uzvojnice na ravninu okomitu na njenu os i Fauchèreovu ljestvicu [110] za dodjeljivanje hidrofobnosti svakoj amino kiselini iz intervala [-1.01, 2.25]. Mrežna aplikacija *3D-HM kalkulator* (<https://www.ibg.kit.edu/HM/> pristup travanj 2022.) [129] daje realističniji trodimenzionalni hidrofobni moment (3D-HM) temeljen na raspodjeli hidrofilnih i hidrofobnih područja i nabojima pojedinih atoma. Rezultati *3D-HM kalkulatora* za adepantin-1 u različitim stanjima dani su u **odjeljku 3.1.1.**

2.2 Kiadini

2.2.1 Dizajn i biološka aktivnost

Kiadini su skupina od 6 linearnih peptida u obliku uzvojnice baziranih na sekvenci peptida PGLa-H (KIAKVALKAL) ili umjetno dizajnirani QSAR metodama [54]. Kiadini -1, -2 i -3 dobiveni su supstitucijama Val \rightarrow Gly u dvostrukoj sekvenci PGLa-H (*di*PGLa-H) kiadin-1 supstitucijom Val¹⁵ \rightarrow Gly, kiadin-2 supstitucijom Val⁵ \rightarrow Gly, a kiadin-3 supstitucijom oba valina u glicin (V⁵ \rightarrow G + V¹⁵ \rightarrow G). Kiadini -4, -5 i -6 su *ab initio* dizajnirani pomoću *Designer* algoritma prema definiranom skupu pravila temeljenom na promatranim značajkama skupa prirodnih peptida [11]. Ukratko, ova pravila zahtijevaju prisutnost ponavljajućih motiva koji se često opažaju u AMP-ovima sa strukturom uzvojnice, kao i dovoljnu amfipatičnost, dopuštajući određenu strukturnu fleksibilnost tako da se α -uzvojnica može produljiti prema 3_{10} – konformaciji. Nadalje, slijed aminokiselina bi trebao rezultirati vrijednošću D-deskriptora koji daje visok indeks selektivnosti (SI). Na taj način dobiveni peptidi imaju $\leq 50\%$ različitih ostataka u odnosu na *di*PGLa-H, između ostalog kiadini -4 i -5 imaju po četiri glicina na mjestima A³ \rightarrow G + L⁷ \rightarrow G + K¹⁴ \rightarrow G + K¹⁸ \rightarrow G i K⁴ \rightarrow G + L⁷ \rightarrow G + K¹⁴ \rightarrow G + L¹⁷ \rightarrow G, respektivno, a kiadin-6 ima jedan glicin, K¹⁴ \rightarrow G. Bez obzira na postupak dizajna peptidne sekvence su dovoljno slične (svaka ima 20 ostataka, sa $\geq 50\%$ identičnih (**tablica 2**)) da se mogu smatrati jednom obitelji nazvanom *kiadini* [54].

Navedenim supstitucijama ukupni naboj peptida (+7) nije promijenjen, i iako srednja hidrofobnost po aminokiselinskom ostatku opada s povećanjem broja glicina, oni različito utječu na amfipatsku strukturu, tako da kiadini -4 i -5, sa po četiri glicina imaju najveći i najmanji srednji 2D hidrofobni moment (amfipatičnost) po aminokiselinskom ostatku, izračunat prema Eisenbergovoj metodi [109] i Fauchèreovoj ljestvici hidrofobnosti [110] pomoću *HeliQuesta* [108] (**sl. 10 i tablica 2**).



Slika 10 Projekcije uzvojnica kiadina, dobivene pomoću *Heliquest* aplikacije [108]. Strelice prikazuju srednje 2D hidrofobne momente po aminokiselinskom ostatku s vrijednostima prikazanim u **tablici 2**. Hidrofobni ostaci su obojeni žutom bojom, polarni nabijeni plavom (+) te glicini i alanini sivom bojom.

Tablica 2 Sekvence i osnovne fizičko-kemijske karakteristike kiadina određene pomoću *Heliquest* aplikacije [108]. Za proračun hidrofobnih svojstava korištena je Fauchèreova ljestvica [110] s vrijednostima srednje hidrofobnosti u intervalu [-1.01, 2.25] i srednjeg 2D hidrofobnog momenta u intervalu [0, 3.26] (iznos vektora prikazanog na **sl. 10**), te 3D-HM mrežni kalkulator [129].

Peptid	Sekvenca ^a	Naboj ^b	Hidrofobnost ^c	2D-HM ^d	3D-HM ^e ($kT\text{Å}/e$)
<i>diPGLa</i> -H	-----:----- -----:----- KIAKVALKALKKIAKVALKAL-NH ₂	+7	0.44	0.42	23.5±0.5
kiadin-1	KIAKVALKALKKIAK G ALKAL-NH ₂	+7	0.38	0.48	18.1 ± 0.7
kiadin-2	KIAK G ALKALKKIAKVALKAL-NH ₂	+7	0.38	0.41	23.2 ± 0.9
kiadin-3	KIAK G ALKALKKIAK G ALKAL-NH ₂	+7	0.32	0.46	23.9 ± 0.9
kiadin-4	K I GKAL G KALKAL G KAL G KA-NH ₂	+7	0.21	0.65	20.2 ± 0.4
kiadin-5	K I AG K AG K IAK I AG K AG K IA-NH ₂	+7	0.16	0.37	16.3 ± 0.8
kiadin-6	K I AL K ALKALKAL G KALKAL-NH ₂	+7	0.40	0.49	20.2 ± 0.7

a – očuvane amino kiseline obzirom na sekvencu *diPGLa*-H su obojene zeleno. Amino kiseline dobivene drugim metodama i različite od onih u *diPGLa*-H su crne, a Gly supstitucije su podebljane.

b – naboj je definiran na pH = 7

c – srednja hidrofobnost po aminokiselinskom ostatku

d – srednji 2D hidrofobni moment po aminokiselinskom ostatku

e – 3D hidrofobni moment peptida u početnoj strukturi uzvojnice izražen u ($kT\text{Å}/e$), k je Boltzmannova konstanta, T je temperatura u K, Å je 10^{-10} m, a e je elementarni naboj.

Kiadini pokazuju značajne razlike u antimikrobnoj aktivnosti, kako prema Gram-negativnim, tako i prema Gram-pozitivnim bakterijama [54]. Njihove odgovarajuće MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) i MBC (minimalna baktericidna koncentracija) vrijednosti su vrlo slične, što sugerira da su kiadini baktericidni, a ne bakteriostatski. *diPGLa*-H pokazuje snažnu aktivnost prema obje vrste bakterija, u sub- ili nisko-mikromolarnim MIC i MBC vrijednostima. Zamjenom Val¹⁵→Gly u *diPGLa*-H (kiadin-1) dobiva se nešto bolja aktivnost protiv *E. coli*, dok aktivnost protiv *S. aureusa* ostaje ista. Zamjena jednog glicina u *diPGLa*-H na drugom mjestu (Val⁵→Gly, kiadin-2) značajno povećava aktivnost protiv *E. coli*, ali je značajno i gubi u odnosu na *S. aureus* (**tablica 3**) [54], dok zamjena (Val¹⁴→Gly, kiadin-6) uz još nekoliko zamjena (**tablica 2**) pokazuje donekle smanjenu moć protiv obje bakterije. Vidljivo je da male varijacije u sekvenci rezultiraju značajnim varijacijama u učinku, u ovom slučaju na antimikrobnoj aktivnosti i bakterijskom spektru. Uvođenje dvostruke supstitucije glicina u kiadin-3 ili četverostruke (uz još neke zamjene) u kiadin-4 značajnije smanjuje aktivnost protiv obje vrste bakterija, ali manje za *E. coli*. Četverostrukom supstitucijom glicina na drugim mjestima uz još neke zamjene (kiadin-5) potpuno se poništava antimikrobna aktivnost.

S obzirom na hemolitičku aktivnost, *diPGLA*-H je umjeren citotoksičan, s HC₅₀ od 22 μM (**tablica 3**). Kiadini -1 i -2 imaju sličnu vrijednost HC₅₀, dok je kiadin-6 značajno citotoksičniji. Kiadin-3 pak ima nekoliko puta veći HC₅₀ procijenjen na oko 95 μM. Kiadin-4 (4 Gly) i kiadin-6 (1 Gly) imaju najsnažniju hemolitičku aktivnost, s HC₅₀ oko 11 μM. S druge strane kiadin-5 (4 Gly) nije hemolitičan ni u najvišoj primijenjenoj koncentraciji.

Tablica 3 Antibakterijska aktivnost i toksičnost diPGLa-H i kiadina [54].

Peptid	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		RBC
	MIC ^a	MBC ^b	MIC	MBC	HC ₅₀ ^c
<i>diPGLa-H</i>	1.5	1.5	0.75	1.5	22 ± 2
kiadin-1	0.75	0.75	0.5-1	1.5	22 ± 2
kiadin-2	0.25-0.5	0.5-1	8-16	8-16	26 ± 6
kiadin-3	4	16	16-32	32	95 ± 10
kiadin-4	8	16	16-32	32	11 ± 1
kiadin-5	> 64	> 64	> 64	> 64	n.d.
kiadin-6	1-2	2-4	4	4	10.5 ± 0.5

a – Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) - najniža koncentracija peptida koja ne pokazuje vizualni rast bakterija nakon inkubacije preko noći;

b – Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) - najniža koncentracija bez vidljivog rasta bakterija na MH agaru nakon inkubacije preko noći alikvota peptidnih bakterija uzetih iz jažica koje odgovaraju MIC, 2×MIC i 4×MIC;

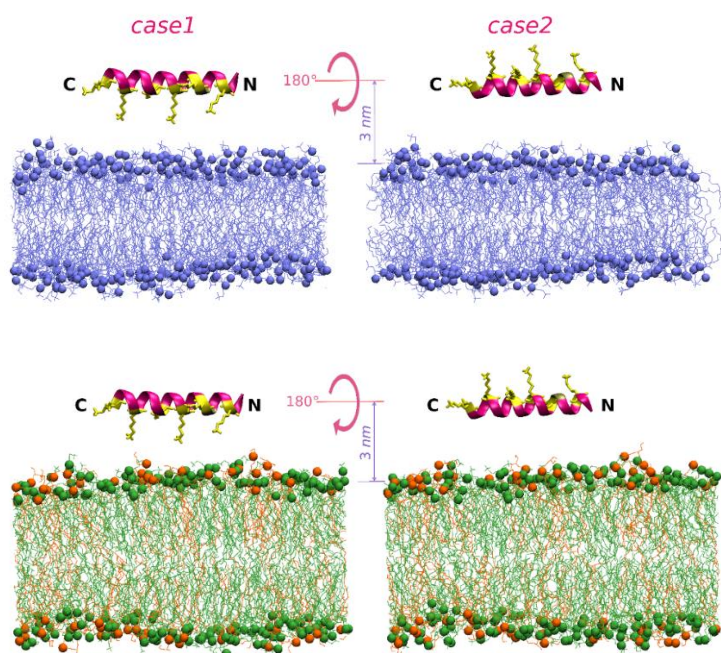
c – Vrijednost HC₅₀ izračunata je kao koncentracija koja uzrokuje 50% hemolizu (RBC – engl. *red blood cell*)

Sve vrijednosti su izražene u μM koncentracije.

2.2.2 Simulacije

Simulacije molekulske dinamike provedene su na *diPGLa-H* i šest dizajniranih kiadin peptida u zatvorenom okruženju koje se sastoji od neutralnog DLPC dvosloja ili negativno nabijenog POPE:POPG dvosloja uronjenog u vodu. Početne konformacije za sve peptide dobivene su QUARK prediktorom [94], koji je rezultirao strukturama α -uzvojnice za sve sekvence. Gromacs verzija 2019.3 [93] korištena je za sve simulacije, primjenom GROMOS (54A7) polja sile [87], [130], [91] na molekule peptida i DLPC lipida i GROMOS-CKP polja sile na POPE i POPG molekule lipida [131], [132], [43] dok je SPC model (engl. *simple point charge*) korišten za molekule vode [133].

Provedene su po dvije simulacije (označene *case1* ili *case2*) za svaki peptid sa svakom vrstom membrane. U *case1* simulacijama peptid je postavljen paralelno, 2.5 nm udaljen od površine lipidnog dvosloja (udaljenost između središta mase peptida i prosječnog položaja atoma fosfora P u gornjem sloju), okrenut prema njemu svojom polarnijom stranom. U *case2* simulacijama peptid je rotiran za 180° oko osi uzvojnice tako da je u početnoj konfiguraciji bio okrenut prema površini membrane svojom hidrofobnijom stranom. Početne konfiguracije prikazane su na **sl. 11**.



Slika 11 Početne konfiguracije u MD simulacijama kiadina s neutralnom DLPC i anionskom POPE:POPG membranom. Peptidi su predstavljeni kao vrpčasti modeli s hidrofobnim i Gly ostacima u magenta i polarnim u žutoj boji, s istaknutim Lys ostacima prikazanim štapićima. Membranski fosfolipidi prikazani su plavom bojom za DLPC membrane (**gore**) i zelenom i narančastom bojom za POPE i POPG (**dolje**), s P atomima predstavljenim kuglicama i acilnim lancima kao linijama.

Neutralni lipidni dvosloj, kreiran postavljanjem 128 DLPC molekula u svaki sloj, uronjen je u vodeno okruženje tako da omjer vode i lipida bude > 50 . Anionski sustav sačinjen je od membrane sa 96 POPE i 32 POPG lipida u svakom sloju (omjer miješanja 3:1, s jednakim brojem L- i D-POPG konfiguracija [134]), uronjene u vodeni okoliš s omjerom vode i lipida 40. Konfiguracije POPE i POPG lipida preuzete su iz *Lipidbook* repozitorija [135]. *MemGen* online alat (<http://memgen.uni-goettingen.de/> pristup u veljači 2021) korišten je za generiranje membrana. Detalji o kreiranju inicijalnih struktura opisani su u **odjeljku 9.1.2** u Prilozima.

Naboj peptida (+7) definiran je na pH 7 (**tablica 2**) uzimajući u obzir slobodni N-kraj i amidirani C-kraj. Za neutralizaciju peptidnih naboja u slučaju DLPC membrane dodani su Cl^- ioni, dok su Na^+ ioni dodani za neutralizaciju negativno nabijenog POPE:POPG – peptid sustava. Korišten je postupak temperaturnog usklađivanja (engl. *temperature annealing*) za ekvilibriranje sustava na referentnu temperaturu i tlak ($T = 310 \text{ K}$; $p = 1 \text{ ATM}$), uz odabranu temperaturu koja definira lipide u fluidnoj fazi ($T_M = 272 \text{ K}$ za DLPC [136], 300 K za POPE [137] i 269 K za POPG [138]). Tijekom ekvilibracije, korišten je algoritam za fiksiranje teških atoma peptida i očuvanje njihove strukture α -uzvojnice. Produkcijske simulacije od 300 ns, što je dovoljno za promatranje učinaka vezanja peptida na površinu membrane, izvedene su u izotermno-izobaričnom (konstantan NpT) ansamblu (koristeći Nose-Hoover termostat i Parrinello-Rahman barostat, s vremenskom konstantom od 0.5 ps za temperaturu i 2.0 ps za tlak, uz kompresibilnost od $4.5 \cdot 10^{-5} \text{ bar}$) [124], [125]. Vremenski korak *Leap-frog* integratora bio je fiksiran na 2 fs, a veze su održavane LINCS

algoritmom [88]. Particle-Mesh-Ewald³ (PME) metoda [126] korištena je za proračun elektrostatskih interakcija dok su van der Waalove interakcije ograničene na 1.0 nm. Vrijeme simulacija bilo je $7 \times 2 \times 300 \text{ ns} = 4.2 \text{ } \mu\text{s}$ za DLPC i POPE:POPG sustave, što rezultira s ukupno od $4.2 \times 2 = 8.2 \text{ } \mu\text{s}$ simulacijskog vremena.

Post-simulacijske analize provedene su korištenjem Gromacsovih programa *mindist* i *density* [93], *DSSP* aplikacije [128] i 3D-HM mrežnog kalkulatora (<https://www.ibg.kit.edu/HM/> pristup u veljači 2021) [129].

Program *mindist* računa broj kontakata i minimalnu udaljenost između jedne grupe atoma i niza drugih grupa. U ovom radu se računao broj kontakata unutar granične vrijednosti od 0.6 nm koristeći ove kriterije: i) ako se jedan ili više atoma peptida nađe unutar granične udaljenosti od atoma P fosfolipida u najbližem sloju, to se računa kao jedan kontakt; ii) ako se bilo koji atom svih lizina dođe unutar granične udaljenosti od P atoma fosfolipida u najbližem sloju, to se računa kao jedan kontakt, uzimajući u obzir mogućnost višestrukih kontakata.

Profili gustoće izračunati su za zadnjih 100 ns vremena simulacije, korištenjem Gromacsovog *density* programa: i) distribucija atoma P definirala je položaj dvosloja membrane; ii) raspodjela atoma peptida definirala je položaj peptida; iii) distribucija atoma svih lizina definirala je udaljenost Lys ostataka od membrane.

Vremenska ovisnost sekundarne strukture određena je pomoću programa *DSSP* [128]. Eisenbergovi hidrofobni momenti mjereni su pomoću *HeliQuest* mrežnog kalkulatora [108]. 3D hidrofobni moment (3D-HM), temeljen na trodimenzionalnoj strukturi peptida za početnu i konačnu konformaciju (nakon 300 ns vremena simulacije) određen je pomoću mrežnog 3D-HM kalkulatora [129]. U ovom slučaju, vektor hidrofobnog momenta se određuje iz raspodjele hidrofilnih i hidrofobnih područja i naboja pojedinih atoma, tako da nije ograničen na savršenu strukturu uzvojnice, kao što je slučaj s Eisenbergovim 2D hidrofobnim momentom kojeg računa *HeliQuest*.

³ Polje sila GROMOS je parametrizirano uz korištenje reakcijskog polja (engl. *reaction field*) za dugodosežne elektrostatske interakcije, no kao što je slučaj s još nekim uvjetima u kojima je prvotno kalibrirano, validirano je korištenje i drugačijih uvjeta [175], pa i PME metode umjesto reakcijskog polja [176] [177], koja se često koristi u novije vrijeme, pogotovo u simulacijama nehomogenih sustava poput membranskih [178]. Osim toga, parametri za lipide u polju sila GROMOS-CKP dobiveni su korištenjem PME metode [43].

2.2.3 Eksperimentalne metode⁴

Metoda cirkularnog dikroizma (CD). Spektri cirkularnog dikroizma dobiveni J-710 spektropolarimetrom (Jasco, Tokyo, Japan) rezultat su tri skeniranja provedena s 20 μM koncentracijom peptida, u prisutnosti anionskih (DPPG, *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol*) i neutralnih (DOPC, *1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocholine*) LUV-ova koncentracije 10 mM. Postotak strukture uzvojnice određen je omjerom $\theta_{222}/\theta_{\alpha}$, gdje je θ_{222} molarni elipticitet po aminokiselinskom ostatku izmjeren na valnoj duljini 222 nm, a θ_{α} odgovarajući molarni elipticitet savršene α -uzvojnice iste duljine [139].

Površinska plazmonska rezonancija (SPR). Vežanje peptida na neutralne (DOPC) LUV-ove koncentracije ~ 1 mM ispitano je i površinskom plazmionskom rezonancijom (engl. *surface plasmon resonance*, SPR) pomoću X-100 instrumenta (Biacore, GE Lifesciences). Različite koncentracije peptida u otopini (0.5, 1, 2, 4, 8 i 16 μM) injektirane su brzinom od 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ tijekom 540 s, nakon čega je slijedilo 1200 s disocijacije. Za svaku koncentraciju senzogrami su dobiveni pomoću BIAevaluation aplikacije v 1.1. Svaki eksperiment je ponovljen tri puta za pojedini peptid uz ispiranje puferom nakon svakog mjerenja.

⁴ Eksperimenti su dio kolaboracije Rončević T., Maleš M., Sonavane Y., Guida F., Pacor S., Tossi A., Zoranić L., rad u pripremi.

2.3 Anisaxin-2S

2.3.1 Dizajn i biološka aktivnost

Anisaxini su skupina od pet *cecropinu* sličnih peptida sa strukturom uzvojnice, s primarnim slijedom od 31 amino kiseline, identificiranih rudarenjem dostupnih genomskih i transkriptomskih podataka za morske parazite iz roda *Anisakis* [83]. Istraživanja imunoloških reakcija parazita na prokariotske mikrobe su vrlo važna jer se pretpostavlja da su razvili obrambene mehanizme kojima ne oštećuju eukariotske stanice domaćina koji im je nužan za preživljavanje. Stoga AMP-ovi izolirani iz parazita mogu biti obećavajući izvor potencijalnih lijekova s malom toksičnošću [140].

Anisaxini imaju snažan antimikrobni potencijal, vrlo su djelotvorni *in vitro*, s MIC koncentracijama $< 1\mu\text{M}$, protiv Gram-negativnih bakterija uključujući i one otporne na druge lijekove, nešto slabiji prema referentnim Gram-pozitivnim (MIC koncentracije 2 – 64 μM) bakterijama i neaktivni prema njihovim kliničkim izolatima (MIC $>64\mu\text{M}$). MBC (baktericidne) vrijednosti protiv svih testiranih sojeva slične su MIC (bakteriostatskim) vrijednostima, što sugerira da su anisaxini baktericidni, a ne bakteriostatski. Čini se da njihov način djelovanja uključuje interakciju s membranom i kasniju brzu permeabilizaciju, čak i pri koncentracijama ispod MIC što je potvrđeno i PI (*propidium iodide*) označavanjem bakterija.

Rezultati nadalje sugeriraju da bakterije imaju sposobnost oporaviti se od oštećenja membrane ako se tretiraju koncentracijama ispod MIC-a. Oslikavanje sustavom za mikroskopiju atomskih sila (engl. *atomic force microscope*, AFM) s druge strane ne pokazuje vidljiva oštećenja membrane u prisustvu peptida, čak ni pri koncentracijama nekoliko puta većim od MIC, ali se uočava smanjenje veličine bakterijske stanice. Ovo je neuobičajeno, ali nije nepoznato kod amfipatskih peptida sa strukturom uzvojnice, primjerice melitina, koji uzrokuje jako curenje unutarstaničnog materijala kroz anionske ali i neutralne membrane, bez vidljivih lezija na njima [141], [142]. Nadalje nisu primijećene promjene na kromosomskoj DNA tijekom replikacije ili interferencija s nukleinskim kiselinama ili sintezom proteina do koncentracija nekoliko puta većih od MIC vrijednosti. To znači da mehanizam djelovanja anisaxina ne uključuje inhibiciju unutarstaničnih procesa, odnosno da anisaxini djeluju isključivo na membranu nespecifičnim interakcijama koje dovode do njene mikropermeabilizacije [83].

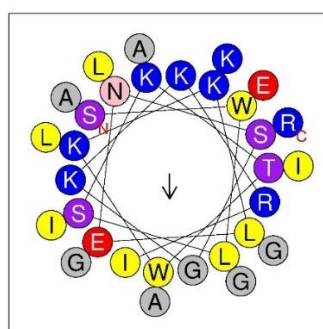
CD spektri pokazuju da su anisaxini nestrukturirani u vodi i da imaju djelomičnu strukturu uzvojnice u 50 % otopini TFE-voda i micelama natrijevog dodecil sulfata (SDS) koje imitiraju membranski okoliš [83]. Najveći sadržaj strukture uzvojnice u TFE-voda i SDS-u imaju anisaxini -2S i -3 (~50%). Omjer elipticiteta $\theta_{208}/\theta_{222} > 1$ sugerira manju mogućnost da peptidi interagiraju s membranama udruženi i u obliku uzvojnice.

Anisaxin-2S (SWLSKTWKKLENSGKKRIAEGIAIALKGGLR-NH₂), najpotentniji je peptid iz skupine, sa MIC vrijednostima od 0.5 μM protiv *E. coli* i 4 μM protiv *P. aeruginosa*, a pokazuje i dobru aktivnost protiv Gram-pozitivne bakterije *S. aureus* sa MIC vrijednostima od 2 - 4 μM . Poput ostalih anisaxina imaju zanemarivu toksičnost prema stanicama domaćina što ih čini

prikladnim kandidatima za nove lijekove [83]. Za usporedbu, melitin, koji ima slične MIC vrijednosti, je jako toksičan u tim dozama i stoga nije pogodan za kliničku uporabu [143][144].



Slika 12 Početna struktura anisaxina-2S u obliku uzvojnice kako ju predviđa C-QUARK [94]. Hidrofobni ostaci su prikazani magenta bojom, hidrofilni žutom s istaknutim Glu u tirkiznoj boji.



Hidrofobnost (H)	Polarni ostaci + Gly (n/%)	Nepolarni ostaci (n/%)
0.256	19 / 61.29	12 / 38.71
2D hidrofobni moment (μH)	Nenabijeni ostaci + Gly	Aromatični ostaci
0.252	Ser 3, Thr 1, Asn 1, Gly 4	Trp 2
Ukupni naboj	Nabijeni ostaci	Posebni ostaci
+6	Lys 6, Arg 2, Glu 2	Cys 0, Pro 0
Hidrofobni sektor: I W A G L G L G		

Slika 13 Svojstva anisaxina-2S – rezultati *HeliQuest* mrežne aplikacije [108]. Hidrofobni ostaci su obojeni žutom bojom, polarni-nabijeni crvenom (-) i plavom (+), polarni-neutralni ljubičastim nijansama te glicin sivom bojom. Za proračun hidrofobnih svojstava korištena je Fauchèreova ljestvica [110] s vrijednostima srednje hidrofobnosti po aminokiselinskom ostatku (H) u intervalu [-1.01, 2.25] i srednjeg 2D hidrofobnog momenta (amfipatičnosti) po aminokiselinskom ostatku (μH) u intervalu [0, 3.26] (iznos vektora prikazanog na slici).

2.3.2 Simulacije

Prediktor strukture QUARK (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/> pristup u veljači 2022.) korišten je za dobivanje modela za početnu strukturu peptida [94]. Predviđene strukture s najvišim rezultatom su struktura α -uzvojnice s prijelomom na Gly²¹ i cijeli peptid u strukturi α -uzvojnice. Odabran je drugi model jer se konformacija α -uzvojnice uglavnom koristi u simulacijama AMP-a (sl. 12). Također, očekuje se da će se svijanje strukture na Gly²¹ opaženo u QUARK modeliranju, pojaviti u simulacijama.

Atomističke simulacije molekulske dinamike provedene su sa jednim, šest, dvanaest i dvadeset i četiri peptida Anisaxin-2S u zatvorenom okruženju koje se sastoji od negativno nabijenog POPE:POPG (omjer miješanja 3:1) ili zwitterionskog POPC membranskog dvosloja uronjenog u vodu, s P/L omjerima od 1/256, 1/128, 1/64, 1/32 i 1/32 respektivno (tablica 4). Detalji koji se odnose na kreiranje inicijalnog zvjezdastog rasporeda anisaxina-2S nalaze se u odjeljku 9.1.3 u Prilozima.

Ispituje se mogućnost ostavarivanja ekstrakcije lipida pri interakciji peptida s membranom, fenomen koji je uočen u eksperimentima i krupnozrnatim simulacijama melitina u interakciji s neutralnom membranom [78]. Radi usporedbe sa anisaxinom-2S, atomističkim simulacijama ispituju se i interakcije melitina s obje vrste membrane u P/L omjeru 1/32 (tablica 4).

Tablica 4 Sažeti popis simulacija anisaxina-2S i melitina u interakciji s POPE:POPG i POPC modelima membrana.

Simulacija	Peptid	Broj peptida	Membrana	Broj lipida	P/L	Početni položaj*	Trajanje (μ s)
I	Anisaxin-2S	1	POPE:POPG	192:64	1/256	Iznad	0.5
II-a	Anisaxin-2S	6	POPE:POPG	576:192	1/128	Na površini	1.0
II-b	Anisaxin-2S	6	POPE:POPG	576:192	1/128	Iznad	0.5
III-1	Anisaxin-2S	12	POPE:POPG	576:192	1/64	Na površini	1.0
III-2	Anisaxin-2S	12	POPE:POPG	576:192	1/64	Na površini	0.5
IV-a	Anisaxin-2S	24	POPE:POPG	576:192	1/32	Na površini	2.8
IV-b	Anisaxin-2S	24	POPE:POPG	576:192	1/32	Iznad	3.0
V-a	Anisaxin-2S	24	POPC	768	1/32	Na površini	2.1
V-b	Anisaxin-2S	24	POPC	768	1/32	Iznad	1.0
VI-a	Melittin	24	POPE:POPG	576:192	1/32	Na površini	0.4
VI-b	Melittin	24	POPE:POPG	576:192	1/32	Iznad	0.2
VII-a	Melittin	24	POPC	768	1/32	Na površini	0.4
VII-b	Melittin	24	POPC	768	1/32	Iznad	0.2

*Početni položaj peptida u odnosu na površinu membrane: Peptidi postavljeni ~2nm iznad površine membrane ("Iznad") i peptidi djelomično umetnuti u polarne regije gornjeg sloja ("Na površini"), paralelno s površinom membrane (vidi sl. 60 - 67)

Simulacije su izvedene pomoću Gromacs verzije 2021.0 [93] s poljem sile CHARMM36m [90] i TIP3 modelom za molekule vode [120]. Početne konformacije pripremljene su pomoću CHARMM-GUI *Membrane Buildera* (<http://www.charmm-gui.org/> pristup u veljači 2022.) [118], [116]. Modeli membrana sastojali su se od POPE i POPG lipida u omjeru miješanja 3:1

(576:192 i 192:64) koji modeliraju unutarnju membranu *E. coli* [100] i zwitterionskih POPC lipida koji oponašaju membranu eukariotskih stanica [58]. Ukupni naboj peptida od +6 definiran je na pH 7 uzimajući u obzir nabijeni N-terminal i neutralni amidirani C-kraj. Sloj vode debljine približno 5 nm dodan je iznad i ispod membrane što je rezultiralo s ~100 molekula vode po lipidu. Sustavi su neutralizirani dodatkom K^+ i Cl^- iona u koncentraciji od 0.1 μM .

Ekvilibracija je napravljena u šest koraka, prema preporukama CHARMM-GUI [117]. Izotermno-izohorna (NVT) dinamika korištena je za prva dva koraka, a NpT dinamika (konstantni tlak i temperatura) korištena je u ostala četiri koraka. U svim koracima je korišten Berendsenov termostat i barostat. Temperatura je fiksirana tijekom ekvibracije i produkcije na 340 K. Tijekom ekvibracije primijenjena su različita ograničenja na dijelove sustava: ograničenja promjene položaja teških atoma peptida kako se početna struktura peptida ne bi značajnije promijenila, ograničenja vertikalnog gibanja P atoma lipida kako bi se zadržali u ravnini površine membrane i ograničenja na veće promjene dihedralnih kutova kako bi se spriječile značajnije strukturne promjene tijekom ekvibracije. Te ograničavajuće sile su se postupno smanjivale u svakom novom koraku ekvibracije [117] (vidi **tablicu 10** u Prilozima).

Uvjeti NpT ansambla u simulaciji zadani su Nose-Hooverovim termostatom i Parrinello-Rahmanovim barostatom, s vremenskom konstantom od 1.0 ps za temperaturu i 5.0 ps za tlak, uz kompresibilnost od $4.5 \cdot 10^{-5}$ bara [124], [125]. Korišten je *Leap-frog* integrator sa vremenskim korakom od 2 fs, a veze među atomima održavane su LINCS algoritmom [88]. Za proračun elektrostatskih interakcija korištena je Particle-Mesh-Ewald (PME) metoda [126] s kulonskom granicom na 1.2 nm. Van der Waalove sile ograničene su tako da za udaljenosti veće od 1.2 nm one iznose nula, pri čemu nakon 1.0 nm počinje njihovo smanjenje.

3 REZULTATI

3.1 Adepantin-1

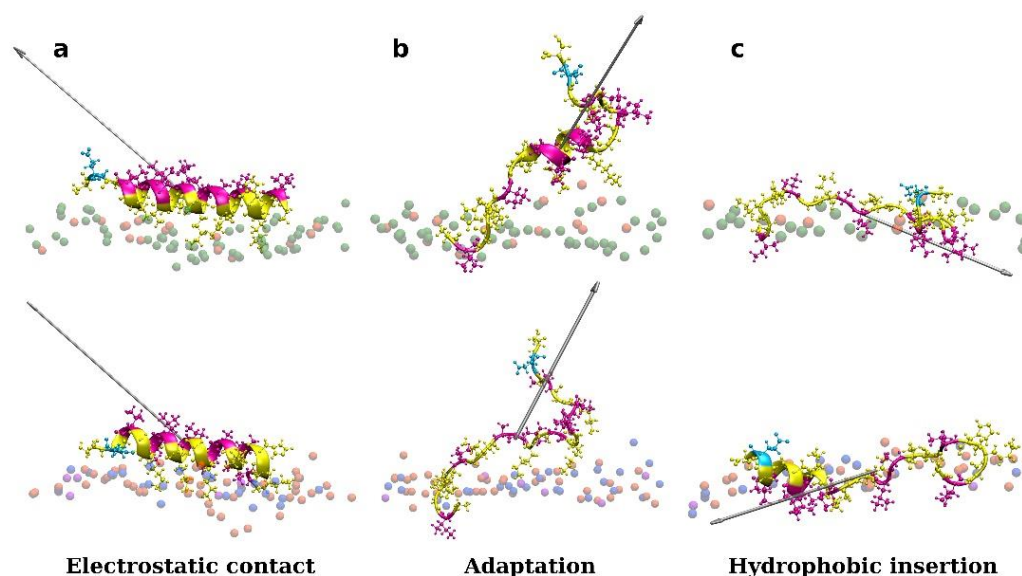
Simulirane su interakcije jednog ili više peptida sa membranama u vodenom okolišu sačinjenim od: 1) POPE i POPG lipida, modela za Gram-negativne membrane; 2) POPG, Lys-PG i PVCL2 lipida, modela za membranu Gram-pozitivnih bakterija; 3) POPC lipida, modela za eukariotsku membranu, i 4) modela vanjske membrane Gram-negativnih bakterija (vidi **odjeljak 2.1.2**).

Glavni fokus je na istraživanju molekularne osnove biološke aktivnosti adepantina-1 u interakciji s bakterijskim i eukariotskim stanicama. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja promatran je u tri koraka:

- I. početni kontakt peptida i nakupljanje na površini membrane,
- II. adaptacija peptida na polarna i hidrofobna područja membrane, i
- III. moguća translokacija peptida i/ili stvaranje pora.

3.1.1 Istraživanje interakcije peptida s unutarnjim membranama AA modeliranjem

U prvim simulacijama jedan peptid postavljen je blizu površine membrane orijentiran tako da se hidrofилne i hidrofobne regije podjednako udaljene od membrane kao što je prikazano na **sl. 8ab**. Adepantin-1 se brzo veže za Gram-negativne i Gram-pozitivne membrane, ali ostaje u otopini kada se postavi u blizinu POPC membrane. Početni kontakt peptida s bakterijskim membranama prvenstveno je posljedica elektrostatskih interakcija jer je nabijena strana peptida usmjerena prema polarnoj površini membrane, a 3D-HM se povećava s vektorom usmjerenim od površine membrane (**sl. 14a, tablica 5**). Tijekom drugog koraka, položaj peptida može fluktuirati između djelomično vezanog i nevezanog stanja, što rezultira povoljnom orijentacijom 3D-HM vektora za umetanje (**sl. 14b**). U ovom koraku, peptid se razmotava i okreće kako bi se hidrofobnom stranom približio jezgri membrane, što je vidljivo iz promjene orijentacije 3D-HM vektora prema unutrašnjosti membrane (**sl. 14c**). Peptid, međutim, ostaje u polarnom području membrane tijekom simulacije od reda veličine jedne mikrosekunde, a predloženi završni korak III u mehanizmu djelovanja adepantina-1 nije opažen.

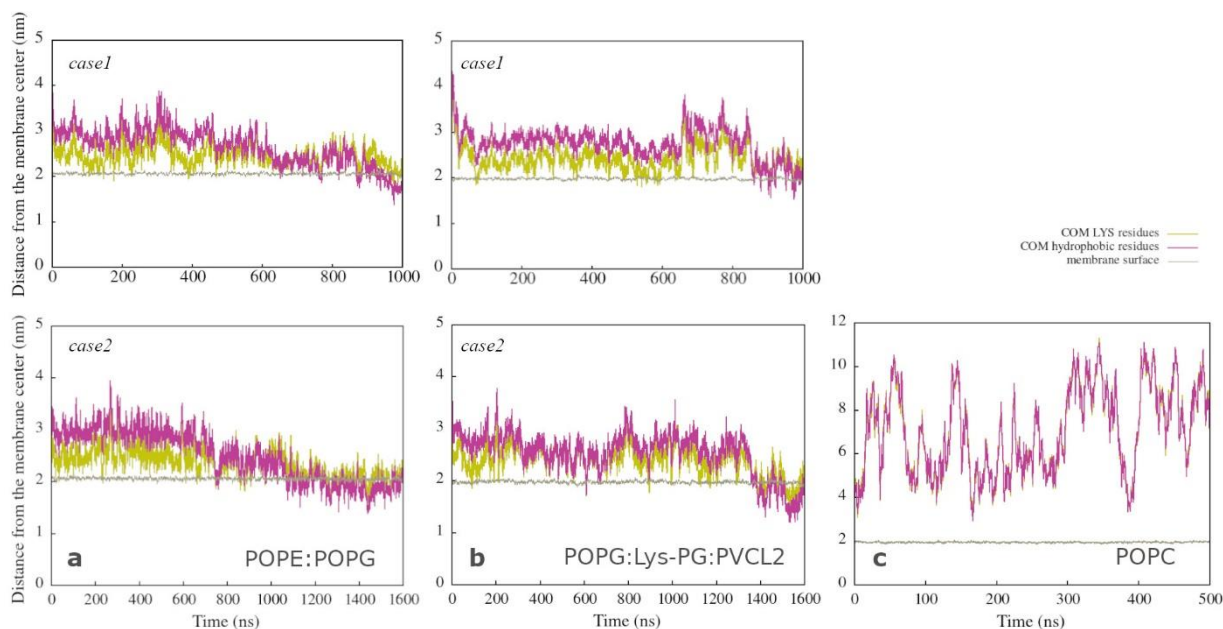


Slika 14 Prikaz adepantina-1 u interakciji s Gram-negativnom (gore) i Gram-pozitivnom (dolje) bakterijskom membranom, gdje stanje (a) pokazuje elektrostatsko vezivanje nabijenih ostataka s lipidima gornjeg sloja, stanje (b) prikazuje promjenu konformacije peptida, umetanje i okretanje, a (c) predstavlja konačno stanje s hidrofobnim ostacima umetnutim u unutrašnjost membrane. 3D-HM vektor je prikazan kao siva strelica, gdje duljina strelice odgovara 3D-HM vrijednosti (**tablica 5**). Peptidi su prikazani kao vrpce i kuglice, s hidrofobnim ostacima u magenta, polarnim i pozitivno nabijenim ostacima u žutoj, i negativnim Glu u tirkiznoj boji. Gornji sloj membrane predstavljen je kuglicama P atoma koji su prikazani zelenom bojom za POPE lipide, narančastom za POPG lipide, plavom za Lys-PG lipide i ljubičastom za PVCL2 lipide. Radi jasnoće, drugi atomi i molekule membrane, kao i molekule vode te ioni, nisu prikazani.

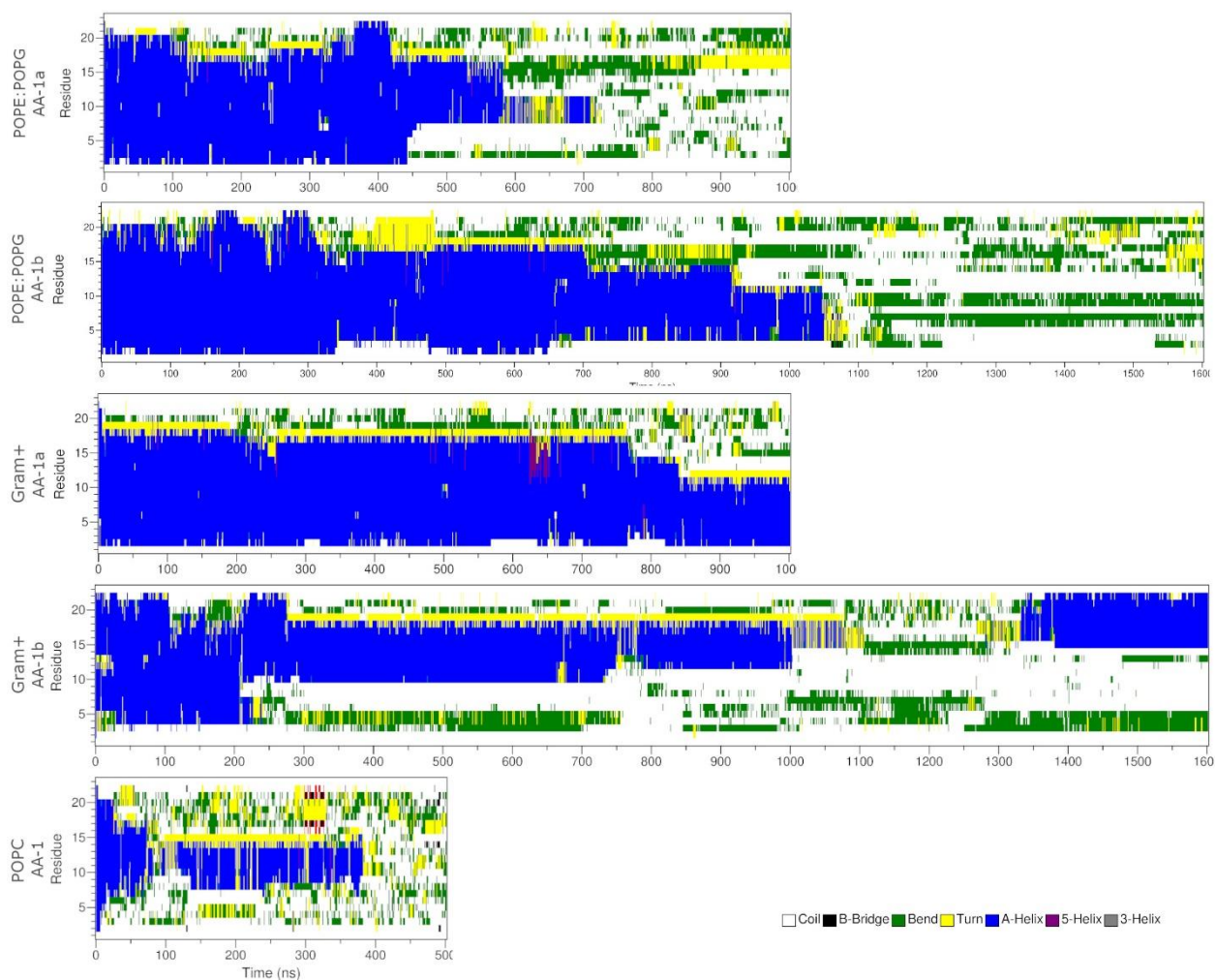
Tablica 5 Moduli 3D-HM vektora i kut između vektora i +z osi u izdvojenim stanjima koja odgovaraju onima opisanim na **sl. 14**. Za izračune su korištene dvije dielektrične konstante: 78.5 za peptid uronjen u otopinu u početnom stanju ($t = 0$) i 20.0 za peptid na granici između otopine i membrane. Rani stadiji interakcije peptida s membranom (**sl. 14a**) su elektrostatske prirode i uzrokuju rotaciju nabijenih ostataka peptida prema membrani i posljedično veliki iznos 3D-HM vektora nakon čega slijedi orijentacija 3D-HM vektora od membrane (kut sa +z osi $< 90^\circ$). Nakon početnog elektrostatskog vezanja, druge interakcije uzrokuju rotaciju peptida i promjenu njegove konformacije uzrokujući smanjenje kuta i iznosa 3D-HM vektora (**sl. 14b**). Konačno, peptid usmjerava svoje hidrofobne ostatke prema membrani što je također praćeno orijentacijom 3D-HM vektora prema membrani (kut sa +z osi $> 90^\circ$) (**sl. 14c**).

Simulacija	Oznaka stanja na sl. 14	t (ns)	Dielektrična konstanta	Modul 3D-HM vektora (AkT/e)	Kut između 3D-HM vektora i +z-osi ($^\circ$)
AA-1a POPE:POPG	a	0	78.5	15.6	82.4
	b	100	20.0	60.7	50.0
	c	580	20.0	35.4	37.7
	c	1000	20.0	29.0	112.0
AA-1b Gram+	a	0	78.5	15.5	82.6
	b	50	20.0	54.2	48.6
	c	1290	20.0	28.4	35.1
	c	1600	20.0	33.2	102.4

Ovi uvidi su također prikazani na **sl. 15**. **Slike 15ab** prikazuju položaj centra mase (COM, engl. *center of mass*) pozitivno nabijenog lizina (žuta linija) i hidrofobnih (magenta) aminokiselinskih ostataka kao funkciju vremena, kao i razinu površine membrane (smeđa linija). Tijekom prvog koraka, polarna strana sa lizinima je bliže membrani (žuta linija je ispod magenta linije), pri čemu ostaje očuvana struktura uzvojnice (**sl. 16**). Drugi korak uključuje konformacijsku prilagodbu peptida na okolinu membrane (obje su linije isprepletene), što rezultira (djelomično) razmotanom strukturom s hidrofobnom stranom uronjenom dublje u membranu (žuta linija je sada iznad magenta linije) u trećem koraku. Peptid u interakciji s obje bakterijske membrane pokazuje slično ponašanje, iako s malo drugačijom strukturom i dinamikom. **Slika 15c** odgovara razmotavanju peptida u vodi (**sl. 16**) u slučaju POPC membrane, koju karakteriziraju veće fluktuacije u COM udaljenostima bez umetanja hidrofилnih i hidrofobnih ostataka u membranu.

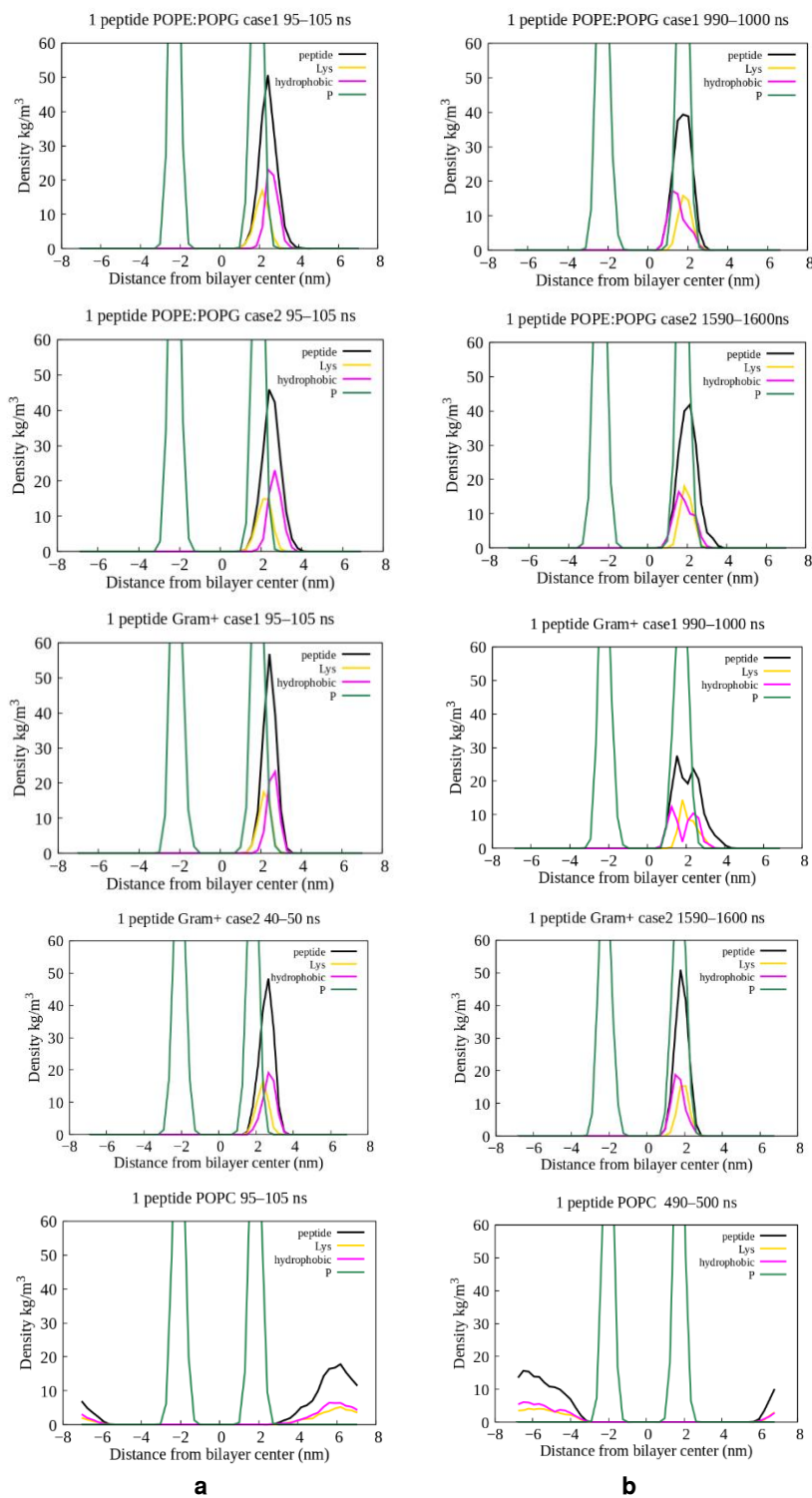


Slika 15 Udaljenosti od središta membrane do centra mase (COM) lizina (žuta linija) i hidrofobnih (magenta linija) ostataka kao funkcija vremena, za simulacije jednog peptida (AA-1) s **(a)** Gram-negativnim, **(b)** Gram-pozitivnim i **(c)** neutralnim membranama. Smeđa linija predstavlja prosječni položaj površine membrane, koja je definirana kao polovica debljine membrane (izračunato alatom *APL@Voro* [97]). Grafovi pokazuju da pozitivno nabijeni lizini u početku dolaze u kontakt s negativnom površinom bakterijskih membrana, potom se položaji hidrofилnih i hidrofobnih ostataka tijekom vremena mijenjaju na način da hidrofobni ostaci bivaju bliži membrani. Kod neutralnih membrana to nije slučaj.



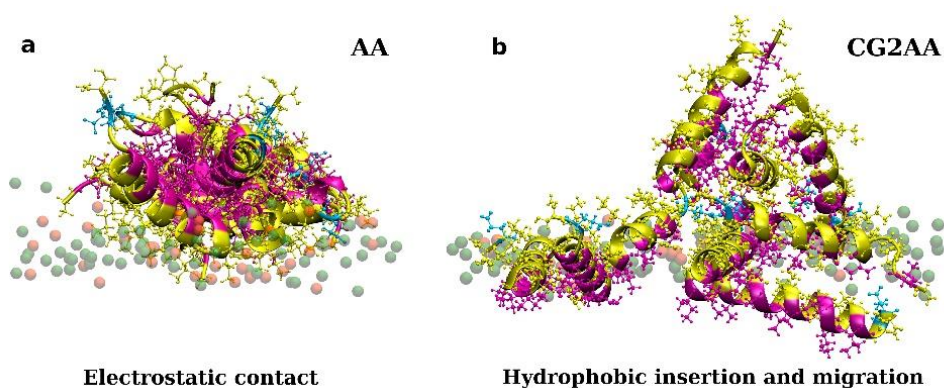
Slika 16 Sekundarna struktura peptida u AA-1 simulacijama.

Analogan opis vidljiv je i na profilima gustoće hidrofobnih i hidrofilnih ostataka (sl. 17). Osim promjene distribucije hidrofobnih i hidrofilnih dijelova, uočava se i pomicanje peptida prema unutrašnjosti membrane tijekom simulacije.

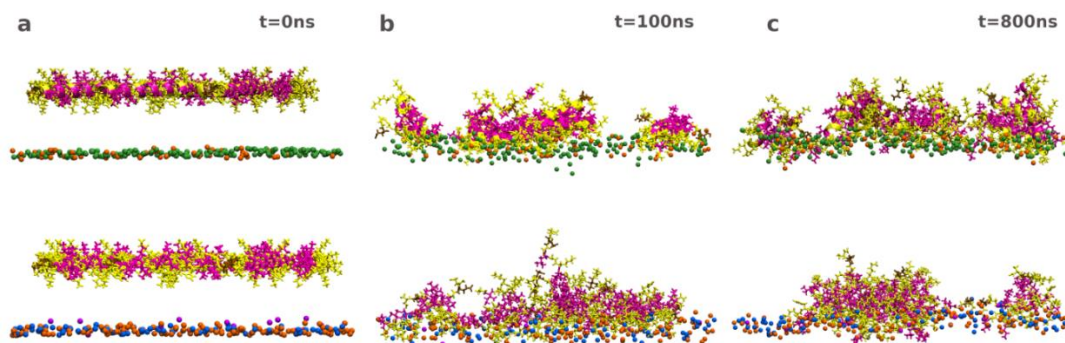


Slika 17 Profili gustoće hidrofobnih (magenta) i pozitivno nabijenih Lys ostataka (žuto), te peptida (crno) i P atoma lipida (zeleno) u AA-1 simulacijama, usrednjeni u naznačenim vremenskim intervalima. **a** – U ranim fazama interakcije peptida s membranom, peptid je usmjeren na takav način da su pozitivno nabijeni lizinski ostaci bliži anionskoj gornjoj površini dvosloja nego hidrofobni ostaci (osim za POPC membranu, gdje ne dolazi do vezanja), podržavajući ulogu elektrostatskih interakcija u početnom vezanju. **b** – U kasnijim fazama hidrofobni ostaci su bliže središnjoj ravni membrane što ukazuje na okretanje peptida tijekom vremena (osim za POPC membranu, kod koje ne dolazi do vezanja) i važnost hidrofobnih interakcija s lipidnim lancima ugljikohidrata nakon početnog elektrostatskog vezanja. Osim promjene distribucije hidrofobnih i hidrofilnih dijelova, uočava se i pomicanje peptida prema unutrašnjosti membrane tijekom simulacije. Profili su napravljeni Gromacsovim alatom *density*.

Slično ponašanje u dva koraka opaženo je kada se više peptida inicijalno postavi blizu bakterijskih membrana (simulacije AA-12 POPE:POPG i Gram+, **tablica 1**). Osim toga proces vezanja također je uključivao vrlo brzu asocijaciju peptida. Formirani klasteri imaju hidrofobne ostatke u kontaktu jedni s drugima okružene hidrofiličnim ostacima koji su izloženi molekulama vode ili površini membrane (**sl. 18 i 19**). Ova struktura klastera se potom mijenja na način da se hidrofilični ostaci u kontaktu s površinom membrane razmiču, izlažući neke od hidrofobnih ostataka membrani (**sl. 19c**). Za vrijeme simulacija (~1 μ s) klasteri ostaju stabilni na površini membrane, s većinom hidrofiličnih ostataka okrenutih prema molekulama vode i nekim hidrofobnim ostacima u kontaktu s lipidnim lancima. Udruživanje se također opaža u simulacijama peptida s POPC lipidima, gdje izostaje vezanje na membranu ili se rijetko događa, a klasteri se stvaraju u vodi (**sl. 24**). Vrijedi napomenuti da udruženi peptidi, u vodi ili u kontaktu s membranom, imaju visoko očuvanu strukturu α -uzvojnice (**sl. 16** i DSSP dijagrami na **sl. 72 - 76** u Prilozima).

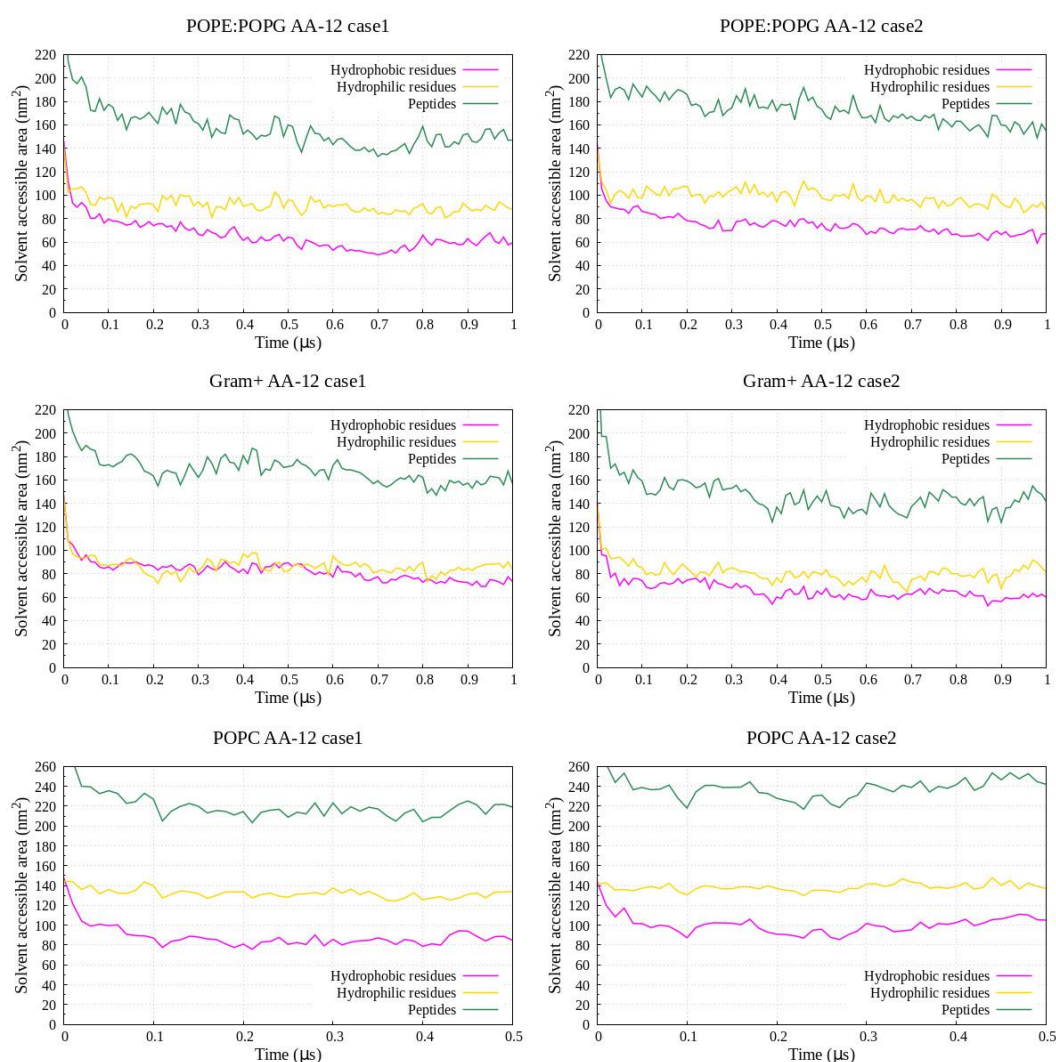


Slika 18 Prikazi dvanaest peptida adepantina-1 u interakciji s unutarnjom membranom Gram-negativne bakterije. Stanje **a** je rezultat simulacije AA-12 koje pokazuje elektrostatsko vezivanje nabijenih ostataka s lipidima u gornjem sloju. Stanje **b** je rezultat simulacije CG2AA, koje prikazuje daljnje korake u interakcijama peptida s membranom u kojima se peptidi, povezani pri početnom vezanju na membranu, odvajaju i migriraju duž površine membrane s hidrofobnim ostacima umetnutim u unutrašnjost membrane. Peptidi su prikazani kao vrpce i kuglice, s hidrofobnim ostacima u magenta boji, polarnim i pozitivno nabijenim ostacima u žutoj i negativnim Glu u tirkiznoj boji. Gornji sloj membrane predstavljen je kuglicama P atoma koji su prikazani zelenom bojom za POPE lipide i narančastom za POPG lipide. Ostali atomi i molekule membrane, kao i molekule vode te iona, uklonjeni su radi preglednosti.



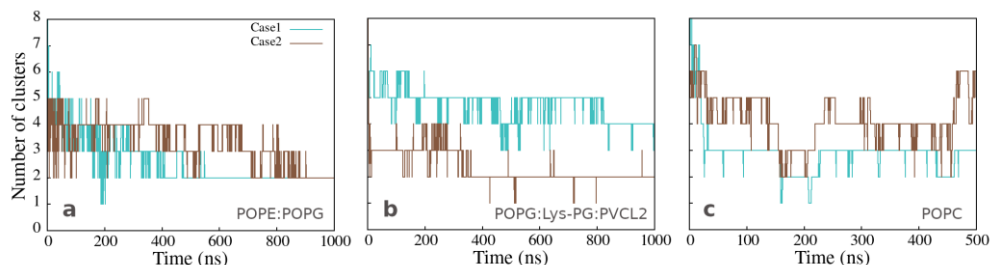
Slika 19 Prikaz prostornih distribucija hidrofobnih (magenta) i hidrofiličnih (žuto) ostataka u različitim trenucima u AA-12 simulacijama (gore: POPE:POPG, dolje: Gram+). Prikazan je samo gornji sloj membrane, predstavljen P atomima (POPE zelena, POPG narančasta, Lys-PG plava, PVCL2 ljubičasta). **a** – početno stanje, **b** – elektrostatsko vezivanje nabijenih ostataka s lipidima gornjeg sloja, **c** – hidrofobni ostaci počinju se umetati u unutrašnjost membrane.

Osim vizualne inspekcije, na opisanu strukturu klastera jasno ukazuje i analiza površine peptida dostupne otapalu (engl. *solvent accessible surface*, SASA) (sl. 20). Smanjenje površine dostupne peptidima s vremenom (zelena linija) ukazuje na udruživanje peptida i/ili vezanje na membranu. Na početku simulacija površina dostupna otapalu je približno jednaka hidrofobnim ($\sim 140 \text{ nm}^2$) i hidrofobnim ($\sim 144 \text{ nm}^2$) dijelovima peptida. S vremenom se više smanjuje površina hidrofobnih dijelova dostupna otapalu (magenta linija) u odnosu na površinu hidrofobnih dijelova dostupnu otapalu (žuta linija), što sugerira njihovo grupiranje u centrima klastera, koji su manje izloženi otapalu od hidrofobnih dijelova. U slučaju anionskih membrana površine se za vrijeme simulacija od $1 \mu\text{s}$ smanje na $\sim 70 \text{ nm}^2$ (hidrofobni dijelovi) odnosno $\sim 90 \text{ nm}^2$ (hidrofobni dijelovi), dok su u slučaju neutralne POPC membrane, vrijednosti svih površina veće jer izostaje vezanje klastera na membranu.



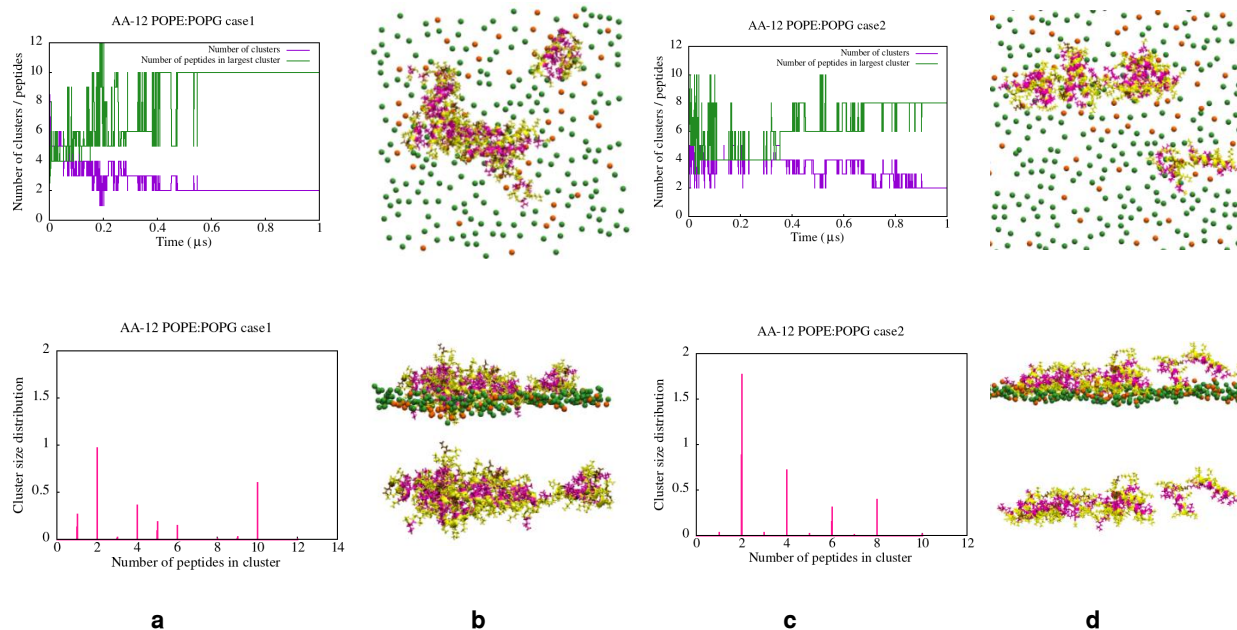
Slika 20 Površina peptida dostupna otapalu (engl. *solvent accessible surface*, SASA) kao funkcija vremena u AA-12 simulacijama. Smanjenje površine dostupne peptidima ukazuje na njihovo udruživanje i/ili vezanje za membranu, a smanjenje površine dostupne otapalu pojedinih dijelova peptida (hidrofobni, hidrofobni) ukazuje na strukturiranje klastera na način da se hidrofobni dijelovi grupiraju u centru, okruženi hidrofobnim dijelovima. Izračunato Gromacsovim programom *sasa*.

Broj klastera kao funkcija vremena, prikazan na **slikama 21ab**, znatno manje varira za peptide vezane na Gram-pozitivnu nego za one vezane na Gram-negativnu membranu, ali uglavnom se prema kraju simulacije formiraju dva klastera u oba slučaja. Ista analiza za klasteru u vodi, promatrana u simulacijama s neutralnom membranom, pokazuje promjenjivi broj klastera koji sadrže dva ili više peptida (**sl. 21c**).

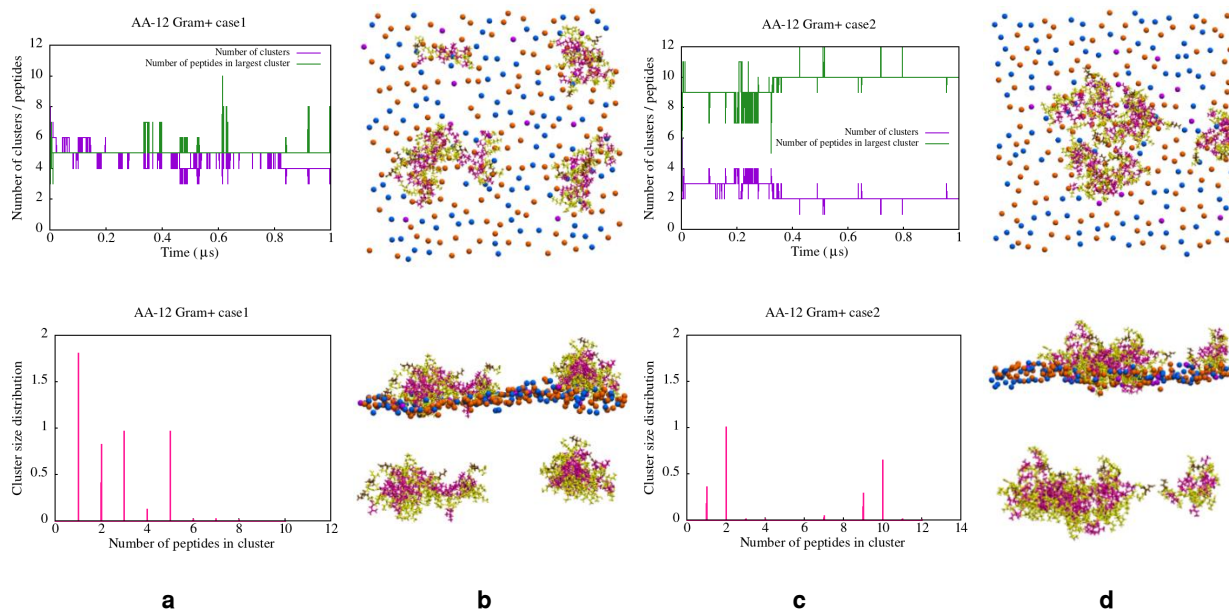


Slika 21 Broj klastera kao funkcija vremena za simulacije dvanaest peptida s (a) gram-negativnim, (b) gram-pozitivnim i (c) neutralnim membranama. Grafovi su napravljeni Gromacsovom alatom *clustsize*, uz uvjet da peptid pripada određenom klasteru ako je udaljenost između njegovog atoma i bilo kojeg atoma u klasteru manja od 0.35 nm.

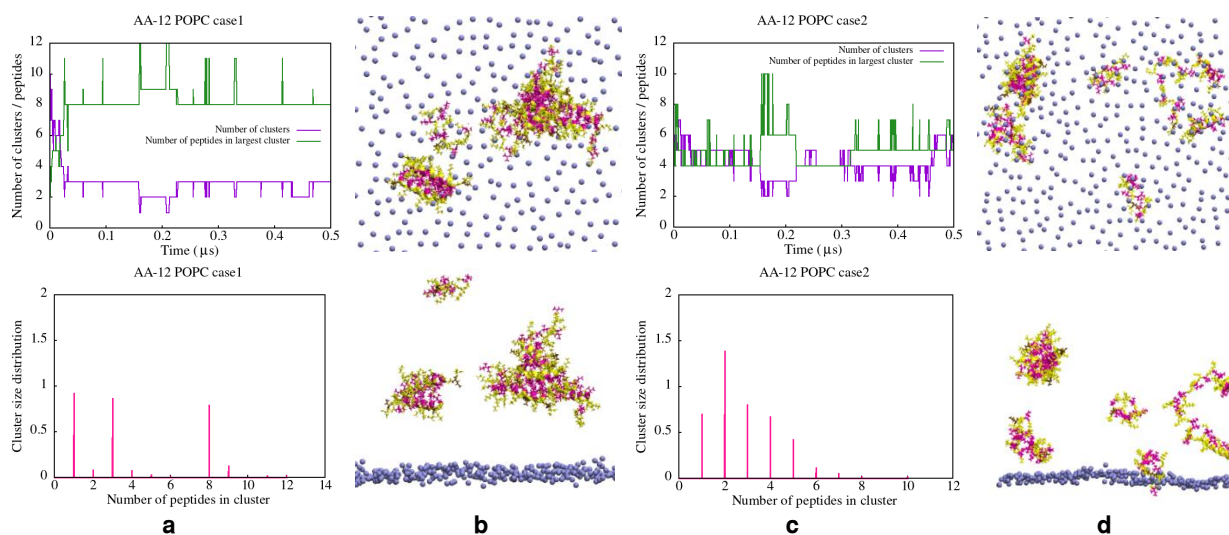
Ostala svojstva klastera kao što su najveća veličina klastera, distribucija veličine klastera i reprezentativne konfiguracije klastera prikazana su na **slikama 22 - 24**.



Slika 22 Analiza klastera izračunata Gromacsovom programom *clustsize* i konačne konfiguracije klastera u AA-12 POPE:POPG simulacijama, **a, b** – rezultati za *case1*, **c, d** – rezultati za *case2*. **a, c gore**: broj klastera (ljubičasto) i broj peptida u najvećem klasteru (zeleno), rezultati pokazuju različit broj klastera tijekom simulacije, koji se pri kraju simulacija svodi na dva klastera. **a, c dolje**: raspodjela veličine odnosno broja peptida u klasterima, pokazuje formiranje klastera različitih veličina, pri čemu su najvjerojatniji dimeri **b, d gore**: pogled odozgo na klasteru u trenutku 1 μ s; **b, d dolje**: pogled sa strane na klasteru u trenutku 1 μ s s prikazanim P atomima i bez njih. Slike pokazuju da u trenutku 1 μ s dva formirana klastera imaju dva odnosno deset peptida. Uočava se razdvajanje hidrofilnih i hidrofobnih ostataka, na način da klasteri imaju hidrofobnu jezgru i hidrofilnu površinu koji su djelomično izloženi membranskom okruženju. Peptidi su prikazani magentom za hidrofobne i žutom bojom za hidrofilne ostatke.

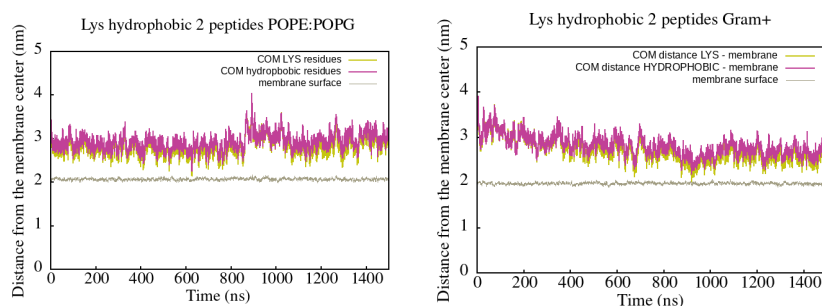


Slika 23 Analiza klastera izračunata Gromacsovim programom *clustsize* i konačne konfiguracije klastera u AA-12 Gram+ simulacijama, **a, b** – rezultati za *case1*, **c, d** – rezultati za *case2*. **a, c gore:** broj klastera (ljubičasto) i broj peptida u najvećem klasteru (zeleno), rezultati pokazuju različit broj klastera tijekom simulacije, klastera male veličine *case1* i jednog velikog i drugog malog klastera male u *case2*. **a, c dolje:** raspodjela veličine odnosno broja peptida u klasterima, i u ovom slučaju dimeri imaju veliku vjerojatnost; **b, d gore:** pogled odozgo na klasteru u trenutku 1 μ s; **b, d dolje:** pogled sa strane na klasteru u trenutku 1 μ s prikazanim P atomima i bez njih. Slike pokazuju, slično rezultatima Gram-negativne membrane, značajno razdvajanje hidrofilnih i hidrofobnih ostataka, na način da klasteri imaju hidrofobnu jezgru i hidrofilnu površinu koji su djelomično izloženi membranskom okruženju. Peptidi su prikazani magentom za hidrofobne i žutom bojom za hidrofilne ostatke.

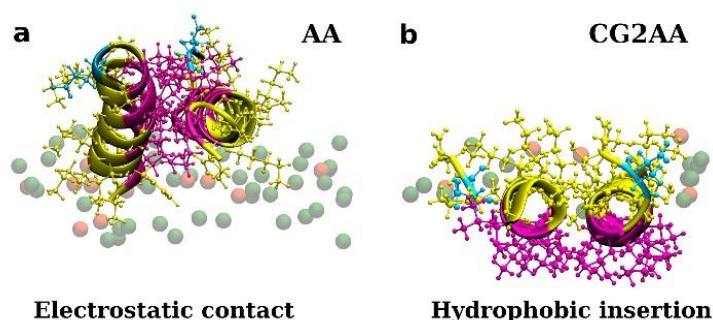


Slika 24 Analiza klastera izračunata Gromacsovim programom *clustsize* i konačne konfiguracije klastera u AA-12 POPC simulacijama, **a, b** – rezultati za *case1*, **c, d** – rezultati za *case2*. **a, c gore:** broj klastera (ljubičasto) i broj peptida u najvećem klasteru (zeleno), rezultati pokazuju različit broj klastera u usporedbi s distribucijom klastera za slučajevne bakterijskih membrana. **a, c dolje:** raspodjela veličine odnosno broja peptida u klasterima, pokazuje da su prisutni klasteri svih veličina, pri čemu su vjerojatniji klasteri s manjim brojem peptida; **b, d gore:** pogled odozgo na klasteru u trenutku 0.5 μ s; **b, d dolje:** pogled sa strane na klasteru u trenutku 1 μ s prikazanim P atomima i bez njih. Slike pokazuju da se klasteri stvaraju u vodi, budući da se ne opaža nikakvo ili rijetko vezanje na POPC membranu, te da je također prisutno snažno odvajanje hidrofilnih i hidrofobnih ostataka. Peptidi su prikazani magentom za hidrofobne i žutom bojom za hidrofilne ostatke.

Analiza klastera je pokazala da u gotovo svim slučajevima postoji velika vjerojatnost udruživanja dvaju peptida. **Slika 26** pokazuje da se dimeri formiraju s očuvanom početnom amfipatskom strukturom α -uzvojnice, s hidrofobnim aminokiselinama u bliskom kontaktu i s anti-paralelnom konformacijom, u kojoj se C-terminalne negativno nabijene Glu aminokiseline nalaze na suprotnim krajevima dimera bez kontakta s drugim peptidom. AA-2 simulacije pokazale su početni elektrostatski kontakt i proces prilagodbe u kojem je dimer fluktuirao između paralelnog i nagnutog položaja u odnosu na površinu membrane. Međutim, nije primijećen prijelaz iz polarnog u hidrofobni kontakt s membranom, a dimer je ostao na površini membrane tijekom simulacije od 1.5 μ s (**sl. 25**). Detaljniji prikaz hidrofobnih interakcija dimera adepantina-1 u stanjima sa **sl. 26** prikazan je na **sl. 46**.



Slika 25 Udaljenosti od središta membrane do centra mase (COM) lizina (žuta linija) i hidrofobnih (magenta linija) ostataka kao funkcija vremena, za simulacije dvaju peptida (AA-2) s Gram-negativnim (**lijevo**) i Gram-pozitivnim (**desno**) membranama. Smeđa linija predstavlja prosječni položaj površine membrane, koja je definirana kao polovica debljine membrane (izračunato alatom *APL@Voro* [97]). Grafovi pokazuju početni elektrostatski kontakt i intervale u kojima je dimer fluktuirao između paralelnog i nagnutog položaja u odnosu na površinu membrane. Međutim izlaganje hidrofobnih dijelova prema membrani nije uočeno tijekom simulacije od 1.5 μ s.



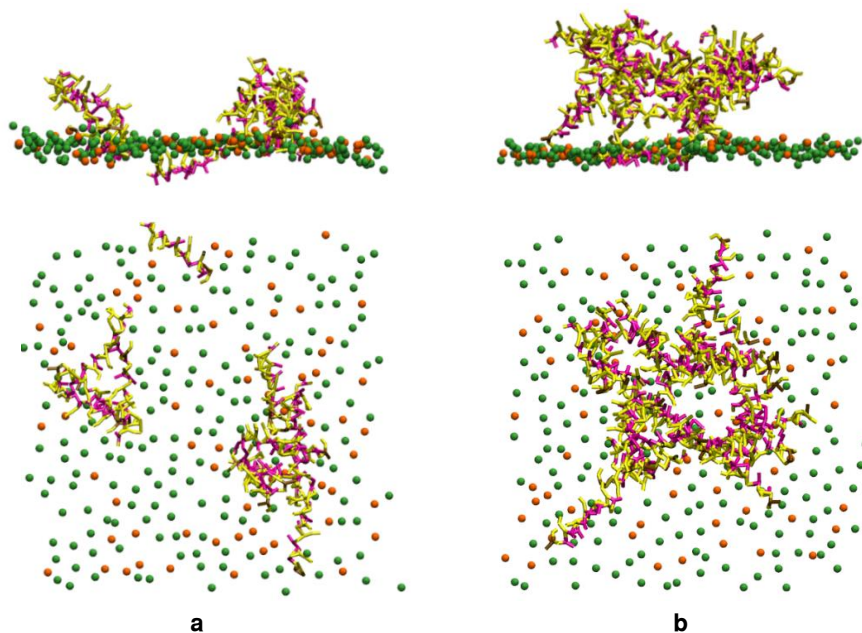
Slika 26 Prikazi dvaju peptida adepantina-1 u interakciji s membranom Gram-negativne bakterije. **a** - stanje u trenutku 200 ns u AA-2 simulaciji pokazuje elektrostatsko vezivanje nabijenih ostataka s lipidima gornjeg sloja. **b** - stanje dvaju (od 12) peptida u trenutku 18 ns u CG2AA-12 simulaciji, koja prikazuje daljnje korake u interakcijama membrane i peptida, gdje se dimer orijentira tako da hidrofobni ostaci dolaze u kontakt s hidrofobnom jezgrom membrane. Detaljniji prikaz hidrofobnih interakcija u navedenim stanjima prikazan je na **sl. 46**. Peptidi su prikazani kao vrpce i kuglice, s hidrofobnim ostacima u magenta boji, polarnim i pozitivno nabijenim ostacima u žutoj i negativnim Glu u tirkiznoj boji. Gornji sloj membrane predstavljen je kuglicama P atoma koji su prikazani zelenom bojom za POPE i narančastom za POPG lipide. Ostali atomi membrane, kao i molekule vode i iona, nisu prikazani radi preglednosti.

3.1.2 Istraživanje interakcija peptida s unutarnjom membranom Gram-negativnih bakterija CG modeliranjem

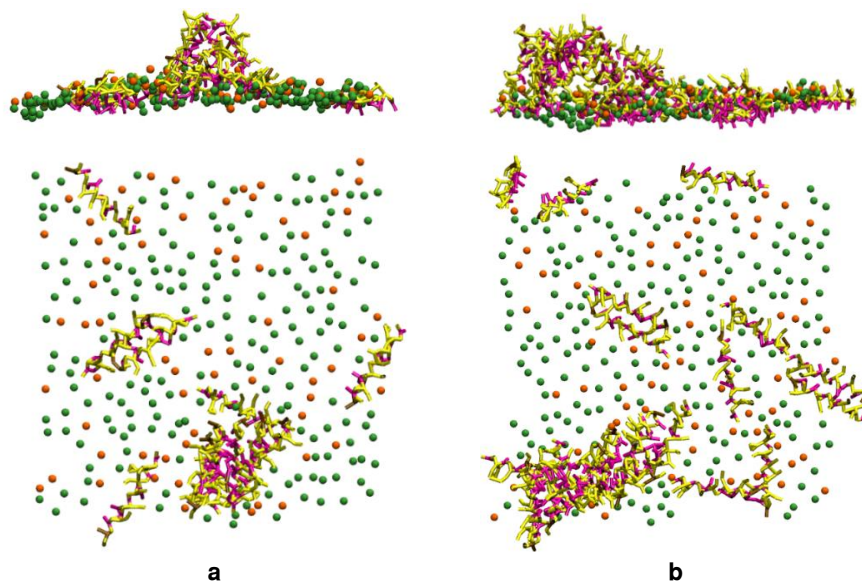
Kako bi se pristupilo duljim vremenima simulacije i mogućem umetanju peptida u membrane, izvršene su CG simulacije s dvanaest (CG-12) ili dvadeset četiri peptida (CG-24) (vidi **tablicu 1**) u interakciji sa Gram-negativnom citoplazmatskom membranom u vodenom okruženju, koristeći početne uvjete slične onima u AA simulacijama. Slučajevi s različitim brojem peptida odabrani su kako bi se istražio učinak različitih omjera peptida i lipida ($P/L \sim 1/64$ i $P/L \sim 1/32$) na mehanizam djelovanja.

Usredotočili smo se na Gram-negativne membrane jer je adepantin-1 učinkovitiji protiv Gram-negativnih nego Gram-pozitivnih bakterija, a simulacije POPE:POPG dvosloja su računski efikasnije. Nadalje, simulacije su nastavljene pretvaranjem konačnih konfiguracija CG modela u AA modele (takve simulacije su nazvane CG2AA, vidi **tablicu 1**) kako bi se dobio detaljniji opis interakcija i mogući prolazak peptida kroz membranu ili narušavanje njenog integriteta. **Slika 9** prikazuje početne konfiguracije u CG-12 i CG-24 simulacijama.

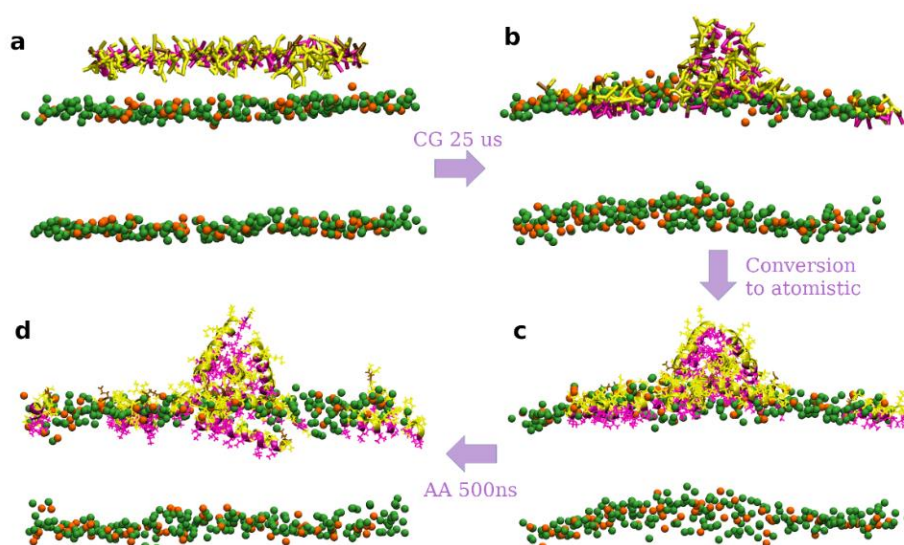
Tijekom 25 μ s CG simulacije, dvanaest peptida u interakciji s bakterijskim membranama pokazalo je slično udruživanje kao u atomističkim simulacijama: (I) početno vezanje s jakom asocijacijom peptida, od kojih su gotovo svi bili dio jednog klastera s hidrofobnom jezgrom i polarnim stranama u kontaktu s vodom ili površinom membrane; (II) adaptacija, tijekom koje se neki peptidi u klasteru reorganiziraju izlažući hidrofobne ostatke hidrofobnom području membrane, pri čemu se neki od njih šire po površini membrane kako simulacija napreduje. Većina peptida ostala je povezana u jednom velikom klasteru tijekom vremena simulacije, a oni koji su migrirali uglavnom ostaju pojedinačni ili tvore agregate od dva peptida. Primjetno je da pojedini peptidi, bili oni dio agregata ili ne, povremeno samostalno prodiru nešto dublje u unutrašnjost membrane, ali se zadržavaju blizu polarnog područja. Slično ponašanje primijećeno je i u CG simulacijama s dvadeset i četiri peptida, sa značajnijom perturbacijom membrane uzrokovanom većom površinskom napetosti zbog većeg P/L omjera vezanih peptida.



Slika 27 Nastanak velikih agregata u ranim fazama (~15 ns) simulacija CG-12 (**a**) i CG-24 (**b**). U pogledu sa strane (**gore**) i odozgo (**dolje**), peptidi su prikazani kao štapići, u magenta boji za hidrofobne i žutoj za hidrofилne ostatke. Membrana je predstavljena kuglicama atoma P zelene boje za POPE lipide i narančaste za POPG lipide. Ostali atomi i molekule membrana, kao i molekule vode i iona izostavljeni su radi preglednosti.

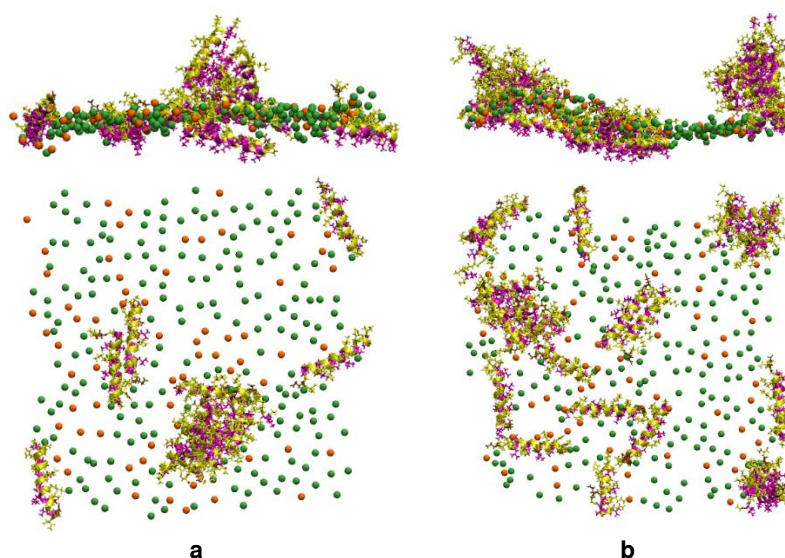


Slika 28 Agregati peptida na kraju simulacija CG-12 (25 μ s) (**a**) i CG-24 (42.5 μ s) (**b**), pogled sa strane (**gore**) i odozgo (**dolje**). Vidljiva je migracija peptida u usporedbi sa stanjima na **sl. 27**. Raspored boja analogan je onima na **sl. 27**.



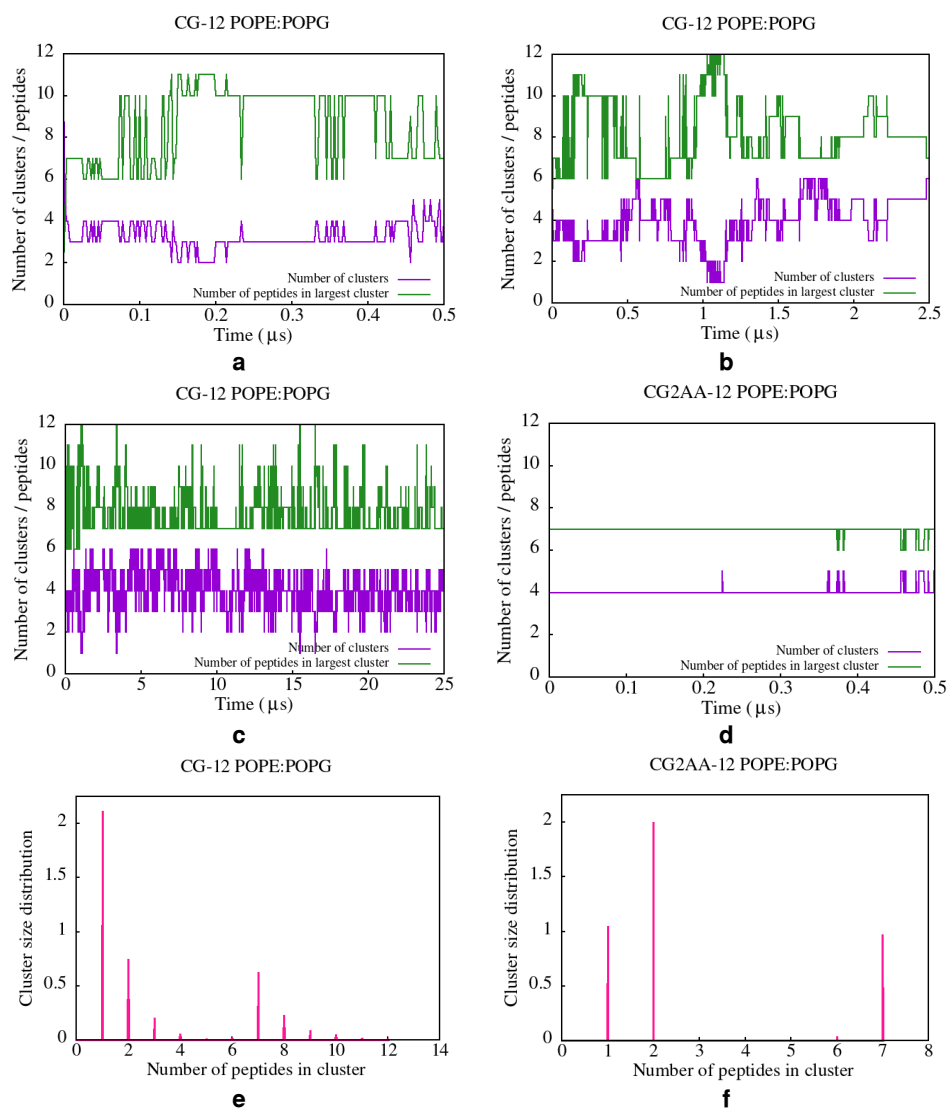
Slika 29 Transformacija krupnozrnatog u atomistički model. Slika **a** predstavlja početno stanje za CG simulaciju, slika **b** predstavlja konačno stanje CG simulacije nakon 25 μ s, **c** prikazuje transformirani CG sustav u AA sustav i **d** konačno stanje CG2AA simulacije nakon 500 ns. Raspored boja je analogan onima na sl. 27.

U CG2AA simulacijama, neki su se peptidi pomaknuli dublje u membranu, ispod polarnog područja membrane, ostajući gotovo paralelni s površinom membrane, s hidrofobnom stranom okrenutom prema središtu membrane (sl. 30), pri čemu značajno zadržavaju strukturiranje u obliku α -uzvojnice, kao što je prikazano na sl. 18b i 26b odnosno *DSSP* dijagramima (sl. 76a u Prilozima). Međutim, čini se da nema vidljive deformacije membrane ili translokacije peptida ni u jednoj simulaciji CG2AA.

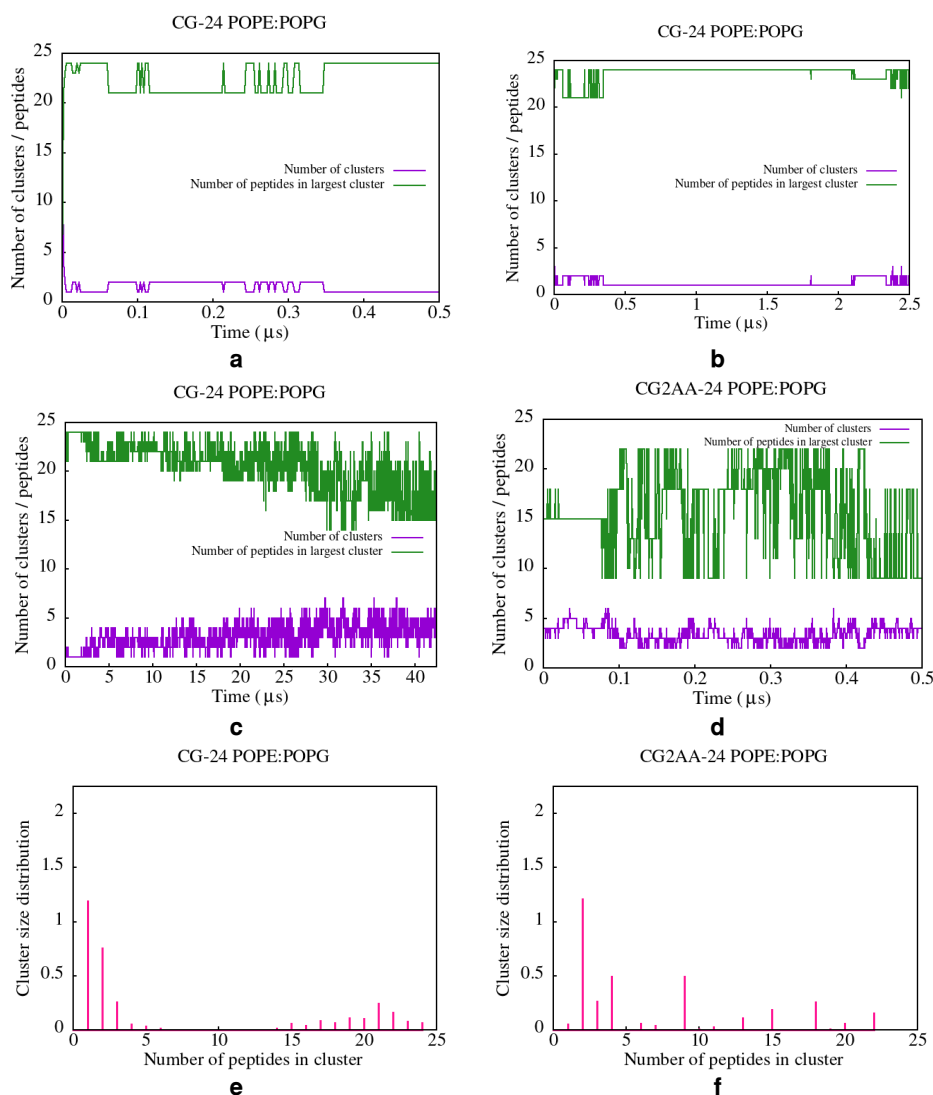


Slika 30 Zadnje konfiguracije u CG2AA simulacijama (500 ns), sa dvanaest (a) i dvadeset i četiri (b) peptida. Peptidi su predstavljeni kao vrpce i linije, s hidrofobnim ostacima obojenim magenta i polarnim i nabijenim ostacima obojenim žuto. Membrana je predstavljena kuglicama atoma P zelene boje za POPE lipide i narančaste za POPG lipide. Ostali atomi i molekule membrana, kao i molekule vode i ioni izostavljeni su radi preglednosti.

Analiza klastera u CG simulacijama otkriva da peptidi preferirano tvore klustere od dva peptida, ostaju kao jedan peptid ili su dio većeg klastera, podupirući rezultate AA simulacija. Ove uvide potvrđuje suprotna korelacija između broja klastera i maksimalne veličine klastera, što ukazuje na postojanje jednog velikog klastera, te bimodalni karakter distribucije veličine klastera koji je najuočljiviji u slučaju CG2AA-12, gdje su klasteri podijeljeni u dvije skupine, jedna sadrži klustere s jednim i dva peptida, a druga klustere od šest i sedam peptida (**sl. 31ef**).

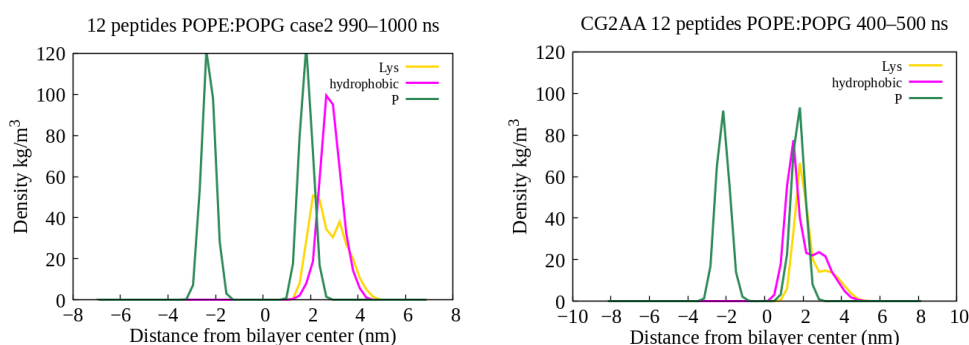


Slika 31 Analiza klastera izračunata Gromacsovim *clustsize* programom za CG-12 i CG2AA-12 simulacije. Peptid pripada određenom klasteru ako je udaljenost između njegovog atoma i bilo kojeg atoma u klasteru manja od 0.35 nm. Rezultati za CG-12 simulaciju prikazani su u **a**, **b**, **c** i **e**, dok su rezultati za CG2AA-12 simulaciju prikazani u **d** i **f**. Dva gornja retka prikazuju broj klastera (ljubičasto) i maksimalnu veličinu klastera (zeleno) kao funkciju vremena simulacije, pri čemu se grafovi u prvom redu (**a** i **b**) odnose na početak CG-12 simulacija (0.5 μ s i 2.5 μ s), grafovi u drugom redu (**c** i **d**) su rezultati za ukupno vrijeme simulacije (CG-12 25 μ s i CG2AA-12 0.5 μ s), dok treći red prikazuje raspodjelu broja peptida u klasterima u simulacijama CG-12 (**e**) i CG2AA-12 (**f**). Rezultati pokazuju varijabilniju distribuciju klastera za CG nego za CG2AA, što je moguće zbog polja sile, ali i zbog znatno duljih vremena simulacija u GG u usporedbi s CG2AA. Međutim, primjetno je da peptidi uglavnom ostaju pojedinačni ili tvore dvopeptidne agregate ili su dio većih asocijacija. O ovim uvidima svjedoči jaka suprotna korelacija između broja klastera i maksimalne veličine klastera, što ukazuje da se formiraju jedan veliki i drugi mali klaster. Također, primjetan je bimodalni karakter distribucije veličine klastera, posebno istaknut u rezultatima CG2AA simulacije gdje se pojavljuju samo klasteri male veličine (jedan i dva peptida) i velike veličine (šest i sedam peptida).



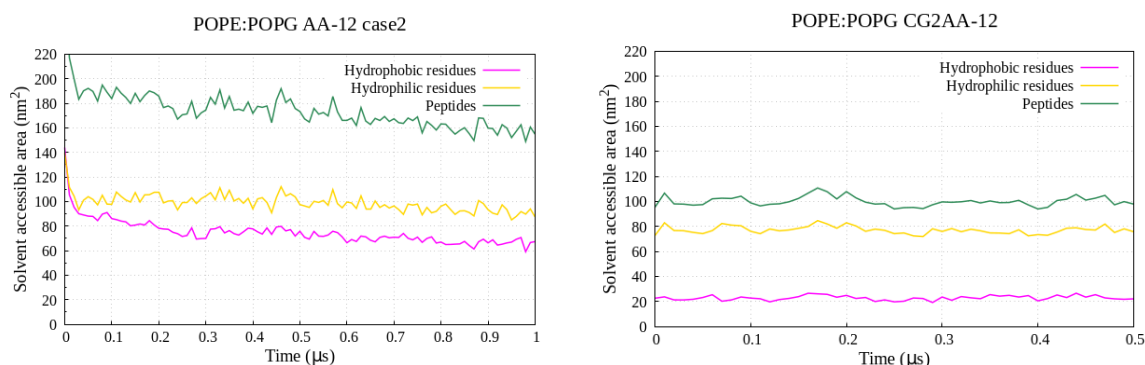
Slika 32 Analiza klastera izračunata Gromacsovim *clustsize* programom za CG-24 i CG2AA-24 simulacije. Peptid pripada određenom klasteru ako je udaljenost između njegovog atoma i bilo kojeg atoma u klasteru manja od 0.35 nm. Rezultati za CG-24 simulaciju prikazani su u **a**, **b**, **c** i **e**, dok su rezultati za CG2AA-24 simulacije prikazani u **d** i **f**. Dva gornja retka prikazuju broj klastera (ljubičasto) i maksimalnu veličinu klastera (zeleno) kao funkciju vremena simulacije, pri čemu se grafovi u prvom redu (**a** i **b**) odnose na početak CG-24 simulacija (0.5 μs i 2.5 μs), grafovi u drugom redu (**c** i **d**) su rezultati za ukupno vrijeme simulacija (CG-24 42.5 μs i CG2AA-24 0.5 μs), dok treći red prikazuje raspodjelu broja peptida u klasterima u simulacijama CG-12 **e** i CG2AA-12 (**f**). U simulaciji CG-24, u početku se peptidi grupiraju u jedan klaster, što je djelomično uzrokovano i početnim rasporedom peptida (vidi **sl. 9b**), ali s vremenom se broj klastera povećava i stabilizira. I ovdje postoji jaka suprotna korelacija između broja klastera i maksimalnog broja peptida u klasteru. Također je vidljivo snažno razdvajanje klastera male i veće veličine u distribuciji veličine klastera, ali samo za CG simulacije. Možemo pretpostaviti da u slučaju simulacije CG2AA-24, broj peptida u jednom klasteru više varira kada je prisutan veći broj peptida (uz istu veličinu membrane) zbog njihove blizine, i zbog toga je bimodalna distribucija manje izražena u usporedbi sa slučajem CG2AA-12. Vrijedno je primijetiti da su u obje simulacije CG2AA najvjerojatniji klasteri oni s dva peptida.

U klasterima formiranim tijekom AA-12 simulacija ($\sim 1 \mu\text{s}$) dio pozitivno nabijenih Lys ostataka ostaje bliže središnjoj ravnini membrane od hidrofobnih ostataka (sl. 33a), što sugerira da je dinamika umetanja sporija nego u slučaju jednog peptida (prva dva reda na sl. 17). Rezultati simulacija CG2AA-12 (dobiveni nakon 25 μs CG i 0.5 μs CG2AA simulacija) otkrivaju isto ponašanje kao u slučaju jednog peptida: neki od hidrofobnih ostataka su bliže središnjoj ravnini membrane nego nabijeni lizini (sl. 33b), što ukazuje na okretanje nekih peptida u klasterima tijekom vremena i važnost hidrofobnih interakcija s acilnim lancima u procesu umetanja peptida u unutrašnjost membrane. Odgovarajući profili gustoće ukazuju i na ukupno približavanje peptida centralnoj regiji membrane nakon duljeg simulacijskog vremena.



Slika 33 Profili gustoće hidrofobnih (magenta) i pozitivno nabijenih Lys ostataka (žuto), usrednjeni u označenim vremenskim intervalima, u AA-12 (lijevo) i CG2AA-12 (desno) simulacijama. U klasterima formiranim tijekom AA-12 simulacija ($\sim 1 \mu\text{s}$) nije došlo do reorijentacije hidrofobnih dijelova prema unutrašnjosti membrane (**lijevo**). Za to je potrebno dulje simulacijsko vrijeme što pokazuju rezultati dobiveni nakon 25 μs CG i 0.5 μs CG2AA simulacija (**desno**). Izračunato uz pomoć Gromacsova alata *density*.

SASA analiza CG2AA simulacija pokazuje značajno smanjenje površine peptida dostupne otapalu ($\sim 100 \text{ nm}^2$) u odnosu na AA-12 simulacije ($\sim 160 \text{ nm}^2$) (sl. 34 zelena linija), što obzirom na podjednake strukture znači više peptida vezanih za membranu i/ili dublje umetanje nakon duljeg simulacijskog vremena. Pri tome je površina hidrofilnih dijelova dostupna otapalu manja za $\sim 11\%$ (sa $\sim 90 \text{ nm}^2$ na $\sim 80 \text{ nm}^2$, žuta linija), a površina hidrofobnih dijelova dostupna otapalu za $\sim 71\%$ (sa $\sim 70 \text{ nm}^2$ na $\sim 20 \text{ nm}^2$, magenta linija) što potvrđuje pomenutu reorijentaciju peptida u klasterima pri kojoj se hidrofobni dijelovi umeću dublje u unutrašnjost membrane (vidi i sl. 30)

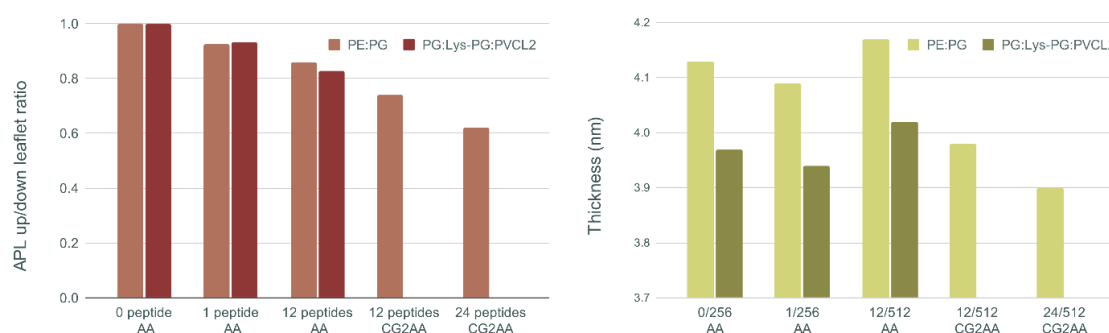


Slika 34 Površina peptida dostupna otapalu (SASA) kao funkcija vremena u AA-12 (**lijevo**) i CG2AA-12 (**desno**) simulacijama peptida u interakciji sa POPE:POPG membranom. Nakon duljeg simulacijskog vremena površina peptida dostupna otapalu je manja za $\sim 62\%$, površina hidrofilnih dijelova za $\sim 11\%$, a površina hidrofobnih za $\sim 71\%$, što sugerira reorijentaciju peptida u klasterima. Izračunato pomoću Gromacsovog alata *sasa*.

3.1.3 Promjene u membranama izazvane interakcijom s peptidima

Nekoliko svojstava membrane određenih sastavom lipida uočeni su kao čimbenici koji pridonose aktivnosti AMP-a [145], [146], [147]. Polarnost i naboji na površini primarno pridonose vezanju peptida, što zatim dodatno inducira razne strukturne i dinamičke promjene kao što su promjene u zakrivljenosti [56], stanjivanje membrane [148], [149] te narušavanje integriteta membrane [150], [151], [65]. Ovdje je učinak izazvan interakcijama peptida s membranom opisan (I) površinom po lipidu (engl. *area per lipid* APL), (II) debljinom membrane i (III) parametrom reda lipida.

I. Površina po lipidu (APL). **Slika 35** lijevo, prikazuje omjer površine po lipidu (APL) gornjeg (na koji se vežu peptidi) i donjeg sloja membrane i desno debljinu membrane, usrednjene tijekom zadnjih 100 ns, za sve slučajeve AA i CG2AA simulacija. Ostali rezultati (APL gornjeg i donjeg sloja, te debljina membrane) prikazani su na **sl. 36 - 40** i u **tablici 6**. Glavni vidljivi učinak je smanjenje APL-a u gornjem sloju zbog mjestimičnog zbijanja lipida izazvanog umetanjem peptida u polarnu regiju gornjeg sloja, što je zbog širenja membrane uzrokovalo širenje lipida u donjem sloju (vidi **sl. 77** i **78** u Prilozima). Smanjenje APL-a je manje u AA simulacijama, ali postaje vidljivije kada se proces interakcije peptida s membranom promatra tijekom duljeg vremena u CG i CG2AA simulacijama. Rezultati CG2AA simulacija također podržavaju činjenicu da viši omjer P/L uzrokuje veći učinak na APL, tj. s višim P/L, omjer APL-ova gornjeg i donjeg sloja se više smanjuje. Rezultati za Gram-negativne i Gram-pozitivne membrane razlikuju se kada se promatraju vremenske ovisnosti, kao što je prikazano na **sl. 36 - 40**, ali sveukupno ponašanje je slično.

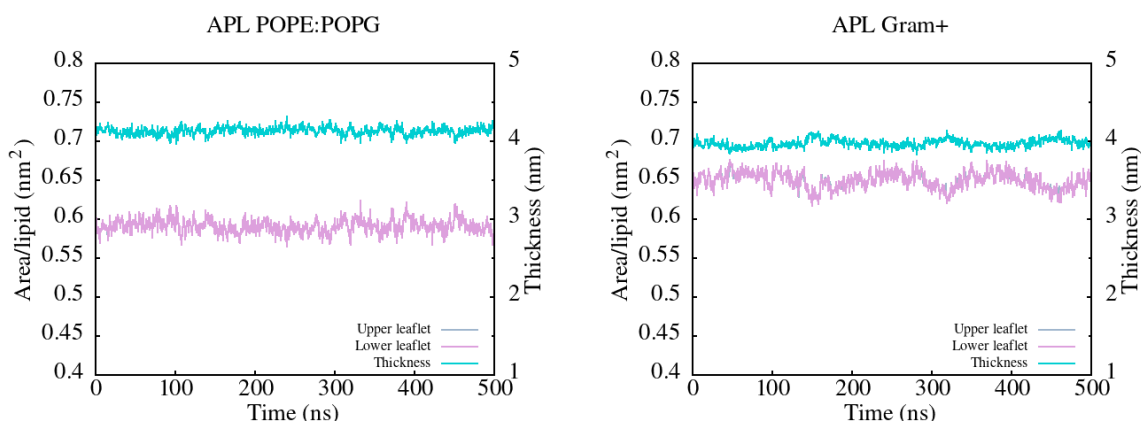


Slika 35. Omjer gornje (na koju se prvotno vežu peptidi) i donje površine po lipidu (APL) usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns (**lijevo**) i debljina membrane usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns (**desno**) za izdvojene AA i CG2AA simulacije. Izračuni su napravljeni pomoću programa *APL@voro* [97].

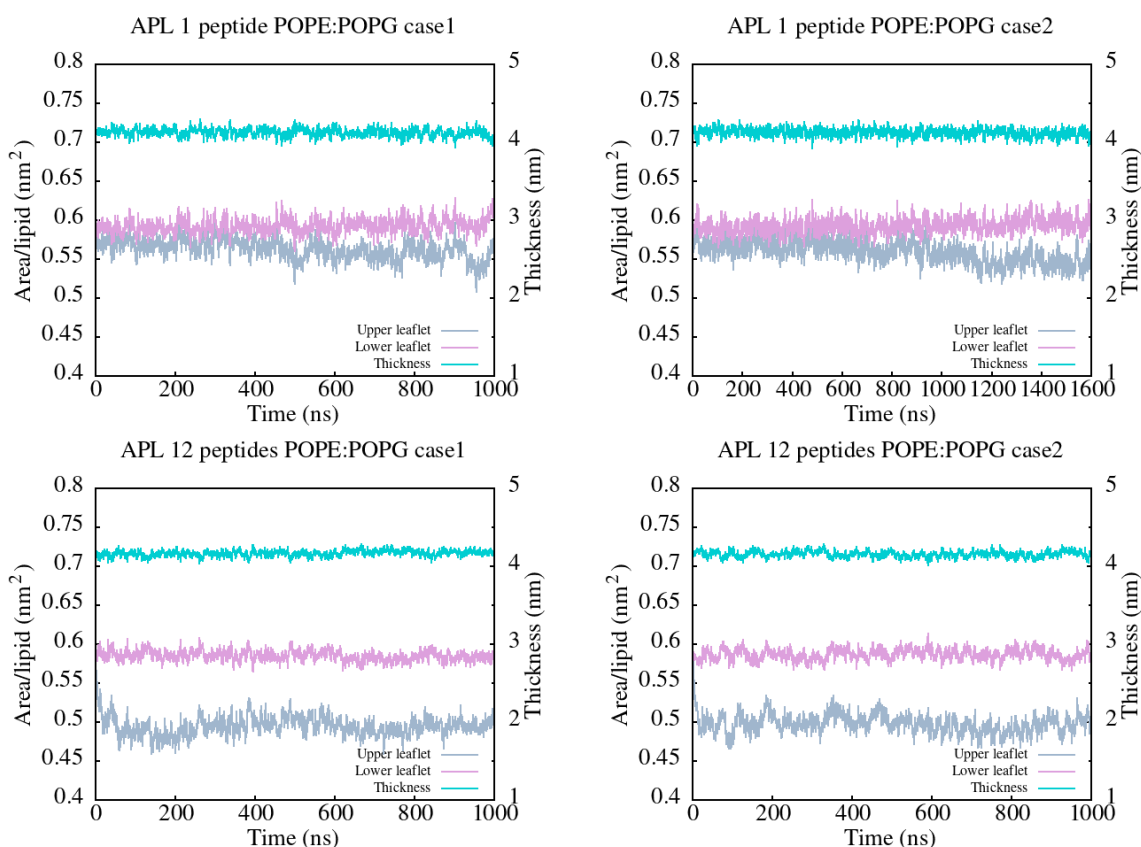
Tablica 6 APL, ukupna površina lipida i prosjek debljine membrane usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns simulacije uz $\Delta_{APL} = \pm 0.01$ i $\Delta_{debljina} = \pm 0.01$ izračunato pomoću programa *APL@voro* (“gore” – gornji sloj na koji se prvotno vežu peptidi, “dolje” – donji sloj).

Simulacija	Membrana	Površina po lipidu (APL) (nm ²)				Debljina (nm)	Ukupna površina lipida (nm ²)		
		Lipid	gore	dolje	omjer		gore	dolje	omjer
AA-0	Gram ⁻	PE:PG	0.59	0.59	1	4.13	75.63	75.63	1
AA-0	Gram ⁺	PG	0.65	0.64	1	3.97	83.15	83.15	1
		LPG	0.64	0.64	1				
		PVCL2	0.77	0.77	1				
		svi lipidi	0.65	0.65	1				
AA-1a	Gram ⁻	PE:PG	0.56	0.60	0.93	4.09	70.64	76.40	0.92
AA-1b		PE:PG	0.54	0.59	0.92	4.10	69.68	76.21	0.91
AA-1a	Gram ⁻	PG	0.61	0.65	0.94	3.97	80.14	83.9	0.96
		Lys-PG	0.62	0.64	0.97				
		PVCL2	0.75	0.76	0.99				
		svi lipidi	0.621	0.652	0.952				
AA-1b	Gram ⁺	PG	0.59	0.66	0.89	3.91	77.94	84.89	0.92
		Lys-PG	0.61	0.66	0.92				
		PVCL2	0.75	0.74	1.00				
		svi lipidi	0.606	0.664	0.912				
AA-12a	Gram ⁻	PE:PG	0.50	0.58	0.86	4.17	128.16	149.80	0.85
AA-12b		PE:PG	0.50	0.58	0.86	4.17	127.70	149.54	0.85
AA-12a	Gram ⁻	PG	0.50	0.64	0.78	4.02	137.00	164.88	0.83
		Lys-PG	0.58	0.64	0.90				
		PVCL2	0.53	0.75	0.71				
		svi lipidi	0.531	0.646	0.823				
AA-12b	Gram ⁺	PG	0.52	0.64	0.81	4.01	136.70	165.70	0.83
		Lys-PG	0.56	0.64	0.88				
		PVCL2	0.58	0.76	0.76				
		svi lipidi	0.538	0.646	0.833				
CG2AA-12	Gram ⁻	PE:PG	0.47	0.63	0.74	3.98	121.20	160.60	0.75
CG2AA-24	Gram ⁻	PE:PG	0.40	0.65	0.62	3.90	102.47	164.84	0.62

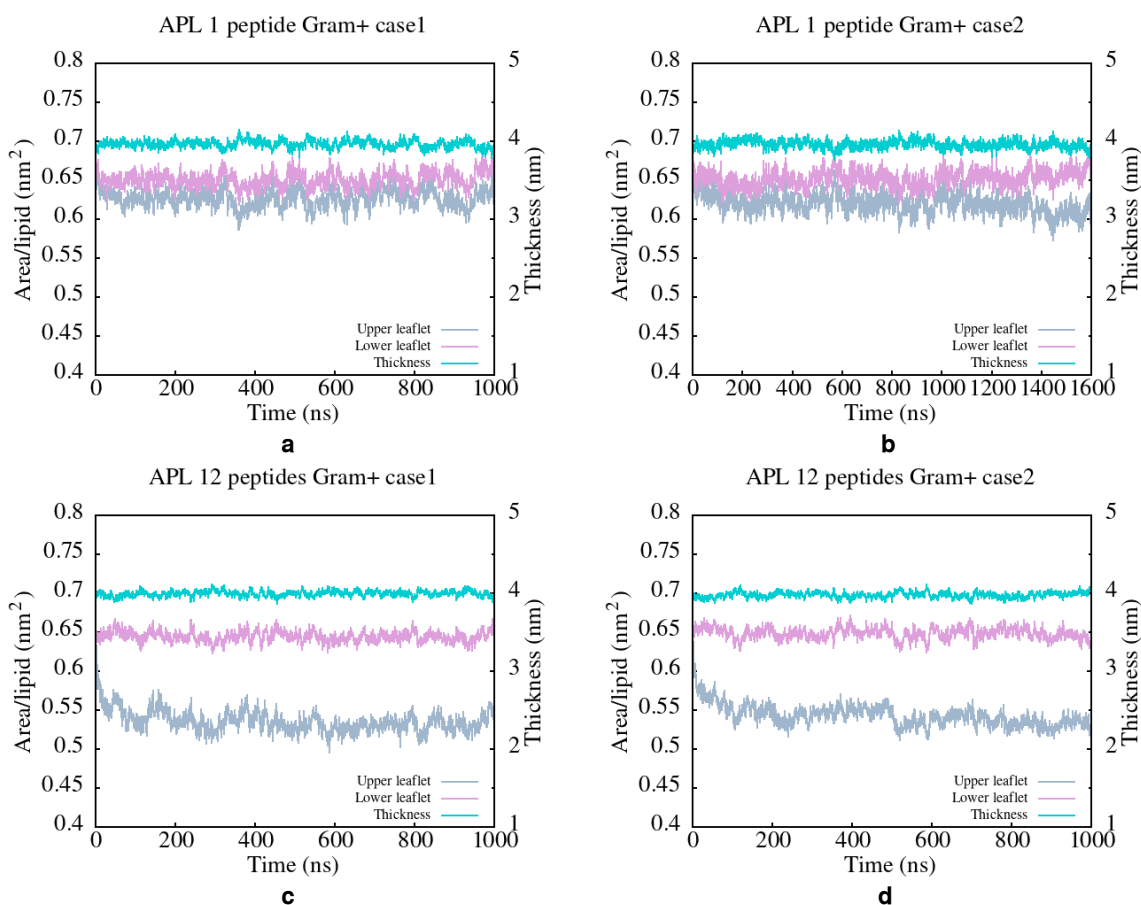
II. Debljina membrane. Rezultati za debljinu membrane slijede sličan trend kao oni za omjer APL, ali s jednom iznimkom, u tome što je debljina izmjerena u AA simulacijama s dvanaest peptida veća nego u AA simulacijama s jednim ili bez peptida. Ova pojava mogla bi se protumačiti kao proces prilagodbe u kojem peptidi izvlače dijelove membrane i šire ju, što je slično prilagodbi uočenoj u slučaju jednog peptida (**sl. 14b**). Simulacije CG2AA, s druge strane, koje kao nastavak CG simulacija uzorkuju stanja u mnogo kasnijim trenucima u odnosu na AA simulacije, otkrile su značajno smanjenje debljine membrane, koja se još više smanjuje kako se P/L omjer povećava, što ukazuje na ovisnost deformacija membrane o vremenskom trajanju interakcija i P/L omjeru. Ove pojave opisuju stanjivanje membrane, što se općenito prihvaća kao dio mehanizma djelovanja AMP-a [65]. Međutim, sve uočene promjene u bakterijskim membranama vrlo su lokalne i ograničene na gornji sloj s peptidima, kao što je prikazano na površinama lipida i profilima debljine (**sl. 77 - 81** u Prilozima)



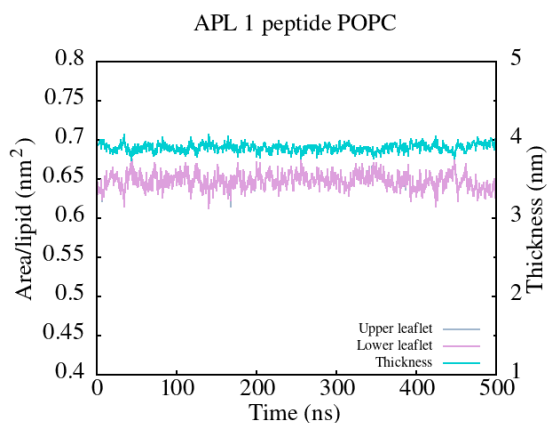
Slika 36 Površina po lipidu (APL) i debljina membrane kao funkcija vremena za čiste membranske sustave (AA-0 simulacije). Rezultati pokazuju da Gram-pozitivna membrana (desno) pokazuje nešto veću fluktuaciju u usporedbi s Gram-negativnom membranom (lijevo). Vrijednosti APL-a dobro se slažu s podacima iz literature: 0.61 nm² na 310 K za POPE:POPG [100] i 0.62 nm² na 313 K za PG:Lys-PG:CL (Gram+) [131] membranski model.



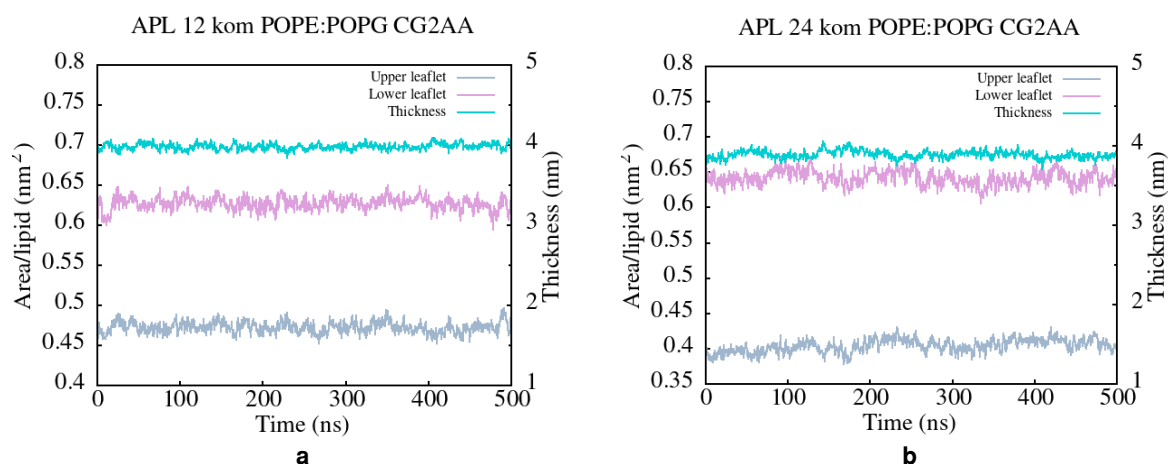
Slika 37 Površina po lipidu (APL) i debljina membrane kao funkcija vremena za AA simulacije Gram-negativne membrane (POPE:POPG). Gornji red prikazuje simulacije AA-1, a donji red simulacije AA-12. Rezultati pokazuju da je za simulacije s jednim peptidom razlika u APL-u gornjeg i donjeg sloja vrlo mala, ali se povećava s vremenom, dok je u slučaju simulacija s dvanaest peptida ta razlika veća, nastaje unutar prvih < 100 ns i ostaje stabilna tijekom vremena. Debljina membrane pokazuje male, ali primjetne promjene u veličini u usporedbi s debljinom otopljenog membranskog sustava bez peptida, ali je također stabilna tijekom vremena.



Slika 38 APL i debljina membrane kao funkcija vremena za AA simulacije Gram-pozitivne membrane (POPG:Lys-PG:PVCL). Gornji red prikazuje simulacije AA-1, a donji red simulacije AA-12. Gram-pozitivna membrana ima veću fluktuaciju APL-a u usporedbi s gram-negativnom membranom, kao što je ilustrirano za otopljene membrane bez peptida na **sl. 36** ali slično ponašanje kada se promatraju promjene u APL-u izazvane peptidima. Slično gram-negativnim membranama, debljina membrane je manja nego kod membrane bez peptida i stabilna tijekom vremena.

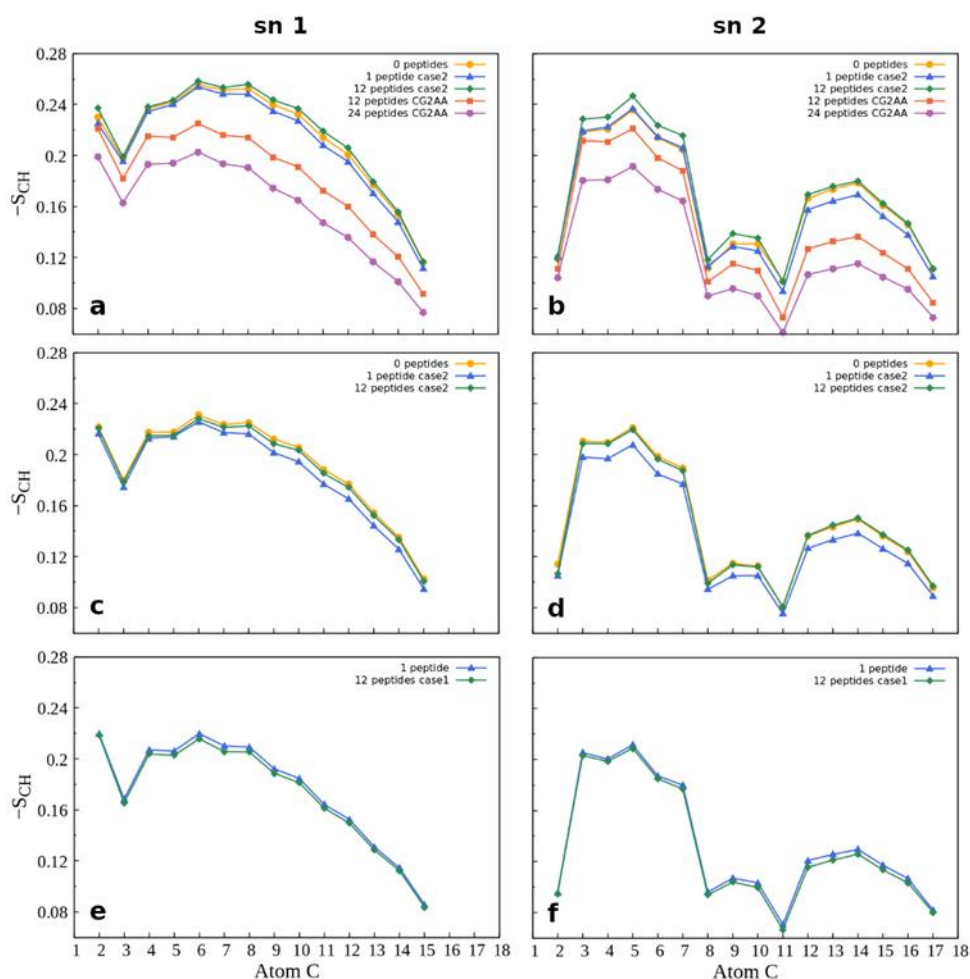


Slika 39 APL i debljina membrane kao funkcija vremena simulacije za AA simulacije neutralne membrane (POPC). Prikazani su rezultati simulacije AA-1, ali isto ponašanje je uočeno u drugim slučajevima simulacije s POPC membranom. Peptidi se ne vežu za membranu, pa rezultati odgovaraju eksperimentalnim podacima za membranu bez peptida: 0.64 nm² na 303 K [152].



Slika 40 APL i debljina membrane za CG2AA simulacije Gram-negativne membrane (POPE:POPG) kao funkcija vremena. Rezultati simulacije CG2AA-12 su lijevo, a rezultati simulacije CG2AA-24 desno. Rezultati pokazuju da je za simulacije s 24 peptida u usporedbi s simulacijom s 12 peptida debljina manja, a razlika APL-a gornjeg sloja u CG2AA-24 veća nego u CG2AA-12 i manja za donji sloj, oboje u usporedbi s čistom membranom (**sl. 36**), što rezultira većom ukupnom razlikom između APL-a slojeva za slučaj CG2AA-24. U obje su simulacije sva svojstva stabilna tijekom vremena.

III: Parametar reda lipida. Svojstvima membrane također se pristupa pomoću parametara reda lipida. Ovdje su prikazani parametri koji mjere orijentacijsku pokretljivost C-H veze za svaki tip lipida i svaki acilni lanac, usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns simulacije. **Slika 41** prikazuje rezultate za POPG i POPC lipide dok su ostali rezultati prikazani na **sl. 82 - 84** u Prilogu. Učinak, koji je posljedica interakcija peptida s membranama u AA simulacijama je mali, ali primjetan. U slučaju Gram-negativnog dvosloja (**sl. 41ab**) vezanje jednog peptida blago smanjuje pokretljivost C-H veze, dok u interakcijama s dvanaest peptida nije došlo do promjene ili je došlo do blagog povećanja parametara reda u odnosu na slučaj membrane bez peptida. U slučaju lipida Gram-pozitivne membrane (**sl. 41cd**), nema gotovo nikakve razlike u parametru reda kad nema peptida ili kad je više peptida vezano na membranu, a smanjuje se kada je jedan peptid u polarnoj regiji membrane. Kao što se i očekivalo, rezultati za POPC parametre reda (**sl. 41ef**) u prisustvu više peptida, a to vrijedi i za druga svojstva neutralne membrane, isti su kao i oni za membranu bez peptida.



Slika 41 Parametar reda $-S_{CH}$ za acilne lance sn-1 (lijevo) i sn-2 (desno) kao funkcija indeksa atoma ugljika. Prvi red (**a**, **b**) prikazuje rezultate za POPG lipide u POPE:POPG membrani, dok drugi red (**c**, **d**) prikazuje izračune za POPG lipide u POPG:Lys-PG:PVCL2 membrani, a treći red (**e**, **f**) prikazuje izračune za POPC lipide u POPC membrani. Za izračune je korišten Gromacsov program *order*.

Slično drugim svojstvima membrane, značajniji učinak primijećen je za simulacije CG2AA, gdje je interakcija peptida s membranom izazvala značajno povećanje orijentacijske pokretljivosti C-H veza acilnog lanca (**sl. 41ab**, crvene i ljubičaste linije). Ukupne rezultate možemo protumačiti na način da nakon početnog kontakta peptida, proces prilagodbe (AA simulacije) ukrućuje bakterijsku membranu, a zatim je, kao što je prikazano u CG2AA simulacijama, čini fluidnijom. Slično ponašanje zabilježeno je i za druge AMP-ove [153].

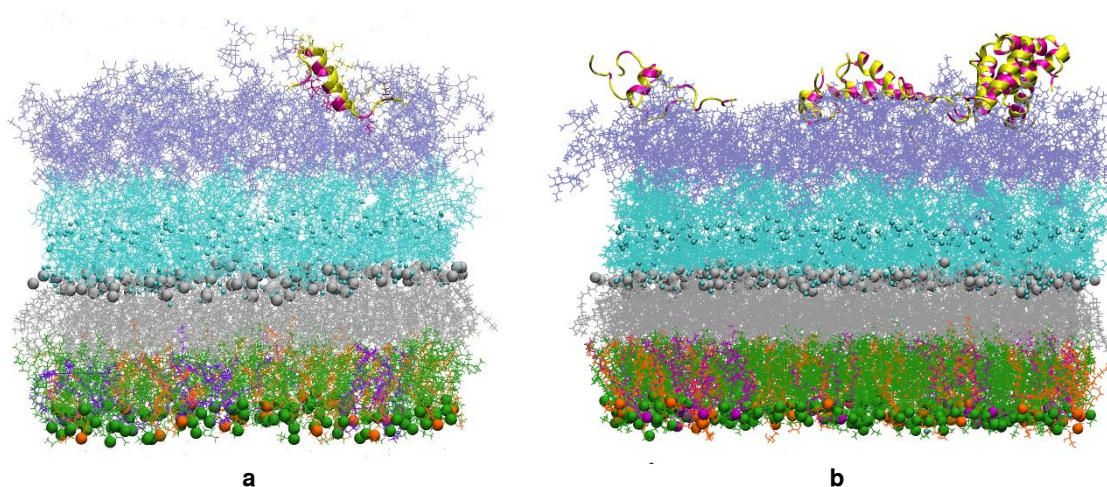
3.1.4 Interakcija peptida s vanjskom membranom Gram-negativnih bakterija

Antimikrobni peptidi moraju interagirati i proći kroz vanjsku membranu Gram-negativnih bakterija prije nego potencijalno naruše integritet unutarnje membrane [154], [155]. Pretpostavlja se da se permeabilizacija vanjske membrane događa putem tzv “mehanizma samopoticanja” [156]. Prema ovoj hipotezi, nakon početnog vezanja kationskih AMP-ova na negativno nabijene LPS-skupine, AMP-ovi se natječu s dvovalentnim kationima (Ca^{2+} ili Mg^{2+}) koji nekovalentno povezuju

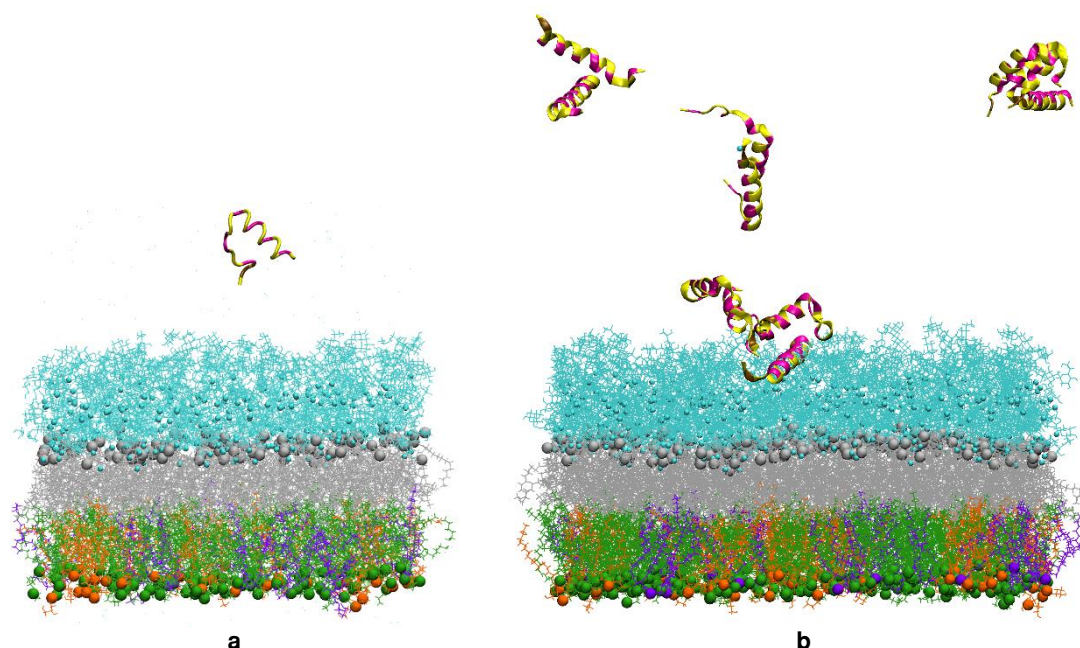
molekule LPS-a. Kationski AMP-ovi naposljetku istiskuju dvovalentne katione jer imaju najmanje tri reda veličine veće afinitete za LPS i mnogo su veći, pri tome lokalno narušavajući integritet vanjske membrane stvaranjem pukotina kroz koje mogu proći. Međutim, još uvijek nije poznato detaljno objašnjenje ovog procesa [157].

CHARMM-GUI [116] mrežna aplikacija korištena je za konstruiranje kompleksnih modela Gram-negativnih vanjskih membrana koje imaju dva (glatka) ili bez (hrapava) O-antigena vezanih na LPS (vidi **odjeljak 2.1.2**). Koliko je poznato autoru ovo je prvi put da je simulirana takva vrsta membrane, čiji specifični sastavi modeliraju vanjsku bakterijsku membranu *E. coli*, u interakciji s peptidima. Atomističke simulacije, slučajevi s jednim i dvanaest peptida, izvedene su kako bi se ispitao afinitet adepantina-1 za različite slojeve vanjske membrane.

U simulacijama glatke vanjske membrane (s 2 O-antigena), peptid(i) se brzo vežu za vanjsku membranu unutar nekoliko nanosekundi (**sl. 42**), ali uglavnom ostaju u regiji O-antigena tijekom simulacije (vidi **tablicu 1** i **sl. 45d**). S druge strane, adepantin-1 pokazao je nizak afinitet za grubu vanjsku membranu (bez O-antigena) (**sl. 43** i **45c**), budući da u simulacijama nije primijećeno nikakvo ili tek sporadično vezanje peptida. Područje jezgre LPS-a, ispunjeno dvovalentnim kationima, može djelovati kao prepreka vezanju peptida na LPS. Također može se pretpostaviti da jako vezanje za O-antigenski sloj omogućuje peptidima pogodno okruženje za istiskivanje kationa te daljnje prodiranje kroz jezgri sloj u slučaju glatkih membrana.



Slika 42 Vanjske membrane Gram-negativnih bakterija s 2 O-antigena (glatka) u interakciji s jednim peptidom (**a**) ili dvanaest peptida (**b**) nakon 500 ns odnosno 400 ns. Peptidi su inicijalno postavljeni u otopinu 2 nm iznad gornje površine membrane. Svi peptidi uglavnom ostaju vezani za membranu tijekom vremena simulacije. PVPE lipidi su zeleni, PVPG lipidi su narančasti, PVCL2 je ljubičast, a lipid A je siv, a svi su predstavljeni štapićima i kuglicama. Područje jezgre LPS-a predstavljeno je tirkiznim linijama, neutralizirajući Ca^{2+} ioni u području jezgre predstavljeni su tirkiznim kuglicama, a 2 O-antigena predstavljena su ljubičastim linijama. Peptidi su prikazani kao vrpce, s polarnim i nabijenim ostacima u žutoj i hidrofobnim ostacima u magenta boji. Molekule vode i ioni iz otopine nisu prikazani radi preglednosti.

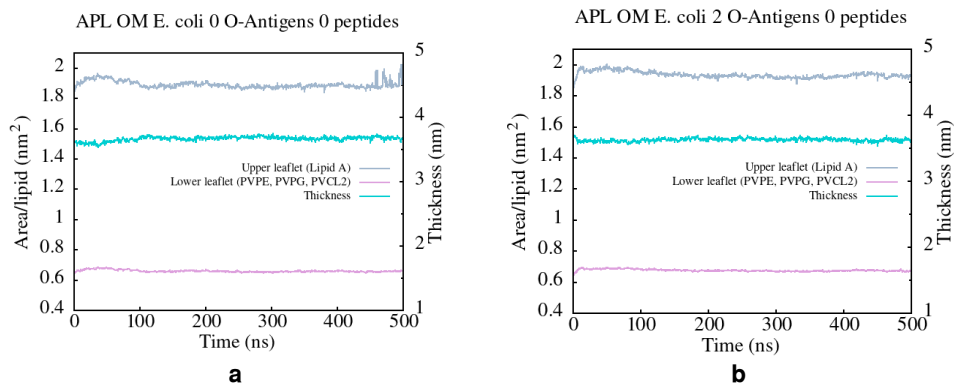


Slika 43 Vanjske membrane Gram-negativnih bakterija bez O-antigena (hrapava) u interakciji s jednim peptidom (**a**) ili dvanaest peptida (**b**) nakon 100 ns. Peptidi su inicijalno smješteni ~2 nm iznad membrane. U oba slučaja, nakon ~100 ns, neki od peptida iskaču izvan simulacijske kutije i vežu se za donji sloj. Raspored boja analogan je onima na **sl. 42**.

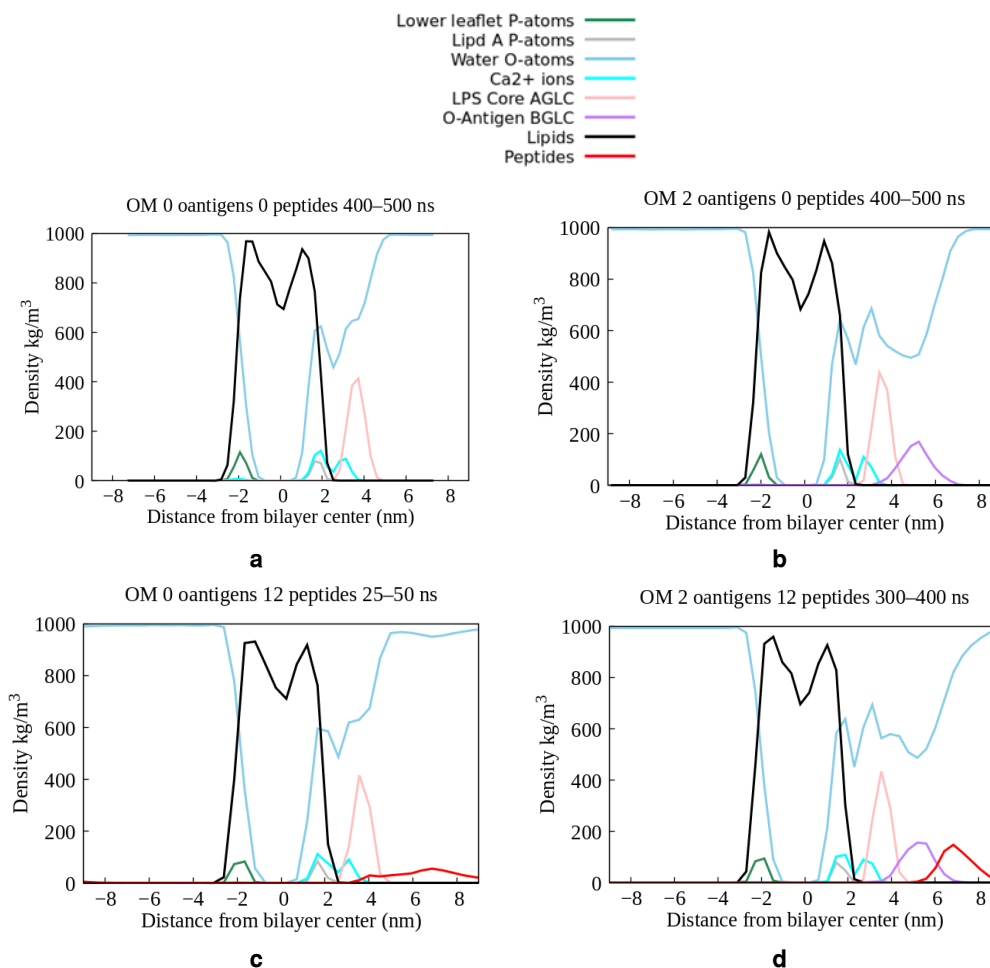
Kao što je navedeno u literaturi, LPS ima vrlo sporu dinamiku, stoga se ne očekuje značajno umetanje tijekom simulacija reda veličine 100 nanosekundi [157]. Sukladno tome, simulacije su zabilježile samo početni kontakt adepantina-1 s vanjskom membranom, ali su također ukazale na razlike u interakcijama peptida s O-antigenom i područjem jezgre vanjske membrane. Daljnja istraživanja, koja uključuju duža vremena simulacije i korištenje naprednih simulacijskih metoda, potrebna su za istraživanje karakteristika mehanizama kojima peptidi prolaze kroz slojeve vanjske membrane.

Tablica 7 Prosječna površina po lipidu (APL) i ukupna površina lipida modela vanjske membrane *E. coli* (AA-0 simulacije, vrijeme simulacije 500 ns). Izračunato programom *APL@Voro*.

Simulacija	Lipid	APL (nm ²)	Ukupna Površina (nm ²)
E. coli OM 0 O-antigena	Lipid A	1.90	94.60
	PVPE:PVPG	0.65	87.99
	PVCL2	0.80	6.37
E. coli OM 2 O-antigena	Lipid A	1.94	96.79
	PVPE:PVPG	0.67	89.79
	PVCL2	0.85	6.90



Slika 44 Površina po lipidu (APL) i debljina membrane (bez LPS-a) kao funkcija vremena za čiste membranske sustave (AA-0 simulacije). **a** - rezultati za hrapavu vanjsku membranu (s 0 O-antigena), **b** – rezultati za glatku vanjsku membranu (s 2 O-antigena). Proračuni su napravljeni programom *APL@Voro*.



Slika 45 Profili gustoće komponenta vanjske membrane usrednjeni tijekom naznačenog vremena, izračunati Gromacovim programom *density*. Prvi red prikazuje rezultate za simulacije čiste vanjske membrane, bez O-antigena (**a**) i s 2 O-antigena (**b**). Drugi red prikazuje rezultate simulacija vanjske membrane s 12 peptida, bez O-antigena (**c**) i s 2 O-antigena (**d**). Legenda se nalazi na vrhu slike.

3.1.5 Diskusija

Simulacije su se pokazale iznimno korisnima u otkrivanju funkcionalnosti membranski aktivnih peptida s atomističkim detaljima [47], [83] [83], [19]. Kontinuirano povećanje računalne snage, učinkovito korištenje GPU-a, kao i razvoj atomističkih i grubo zrnatih modela, ubrzalo je prijelaz sa simulacija pojednostavljenih modela membrana na simulacije višekomponentnih realističnih membrana [158]. Nadalje, korištenje simulacija dobro je podržano dostupnim programima za izgradnju simulacijskih sustava i postsimulacijsku analizu. Ovdje su izvedene atomističke (AA) i krupnozrnate (CG) u kombinaciji s AA simulacijama, s početnim uvjetima što je moguće bližim potencijalnom procesu vezanja, uključujući strukturu α -uzvojnice za koju se očekuje da će peptid poprimiti nakon vezanja. Svaka od specifičnih strategija simulacija bila je usmjerena na promatranje specifičnog dijela u mehanizmu djelovanja adepantina-1.

Rezultati simulacija pokazali su da se adepantin-1 snažno veže na obje vrste citoplazmatskih membrana, Gram-negativnu membranu modeliranu prema *E. coli* i Gram-pozitivnu membranu modeliranu prema *S. aureus*. Male razlike u strukturi i dinamici peptida uočene su u interakcijama s Gram-pozitivnim i Gram-negativnim slučajevima, ali te razlike nisu bile dovoljne da objasne veću antibakterijsku aktivnost primijećenu kod *E. coli* MIC-a u usporedbi s MIC za *S. aureus* (vidi **odjeljak 2.1.1**). Stoga se može pretpostaviti da interakcije s izvanstaničnim komponentama i bakterijskom vanjskom membranom i/ili slojevima peptidoglikana [155], [159], mogu biti važne u definiranju spektra aktivnosti i selektivnosti adepantina-1 za Gram-negativne bakterije. Simulacije su potvrdile da su dimerizacija i multi-peptidne asocijacije važne komponente aktivnosti peptida iz skupine adepantina, kao što je sugerirano analizom CD spektra interakcije adepantina-1 s anionskim LUV-ovima, te većom biološkom aktivnošću uočenom za kovalentno vezane dimere adepantina -2 i -3 ($[ADP-2]_2$ i $[ADP-3]_2$) [82]. Uočena niska hemoliza adepantina-1 također je dobro predstavljena rezultatima simulacije, budući da je simulacija adepantina-1 s POPC membranom (model eukariotskih stanica) otkrila malo ili jako slabo vezanja peptida. Štoviše, postoji korespondencija s mjerenjima CD spektara adepantina-1 u prisutnosti neutralnih LUV-ova, jer oba pokazuju destabilizaciju strukture peptida, koja se, međutim, u simulacijama uglavnom opaža za neklasterirane peptide.

Međutim, mogući mehanizam biološke aktivnosti adepantina-1 s membranom samo je djelomično obuhvaćen simulacijama, a opaženi rezultati prvenstveno su povezani s molekularnim detaljima vezanja i procesa umetanja. Adepantin-1, kao pojedinačni, dimerni ili višepetidni klaster, stupa u interakciju s bakterijskom membranom s početnim elektrostatskim kontaktom s polarnom površinom membrane nakon čega slijedi umetanje hidrofobnih ostataka u hidrofobnu unutrašnjost membrane. Slično ponašanje primijećeno je za antimikrobni peptid PGLa [160], uključujući reorijentaciju i dimerizaciju. Glavna značajka molekularnog mehanizma adepantina-1 je visok afinitet za asocijacije. Klasteri nastaju u otopini ili istodobno s vezanjem peptida na površinu membrane. Ovi agregati prvenstveno nastaju zbog hidrofobnih interakcija, što je vidljivo iz

hidrofobne jezgre i polarne površine klastera. Nadalje, povezani peptidi uglavnom čuvaju početnu strukturu α -uzvojnice, što ukazuje da agregati mogu djelovati kao promotori strukturiranja peptida.

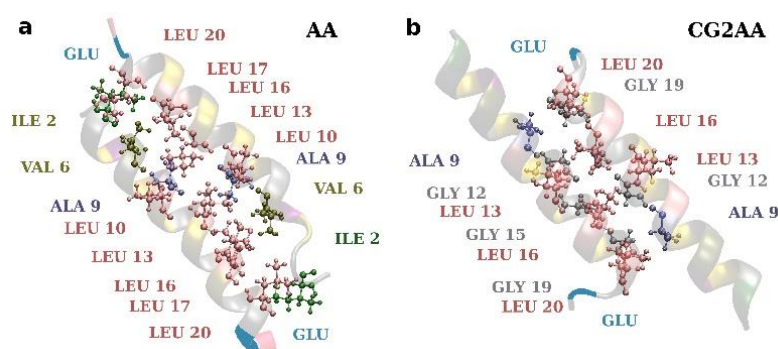
O utjecaju agregacije peptida na antimikrobnu aktivnost još se raspravlja, a ona najvjerojatnije ovisi o vrsti peptida. Na primjer, u značajnom radu, Sengupta i sur. pokazali su da agregacije na ili blizu membrane osiguravaju kritičnu lokalnu koncentraciju potrebnu za aktivnost AMP-a stvaranjem pora [48]. U nedavnoj studiji [52] tvrdi se da samoasocijacije peptida ispoljavaju antimikrobnu aktivnost tako da osiguravaju amfipatsko okruženje koje im omogućuje poprimanje strukture uzvojnice. Suprotan stav zastupaju Zou i sur. koji su pokazali da se antimikrobna aktivnost guaninom modificiranog magainina II i cecropin A-melitina smanjuje s povećanom samoagregacijom peptida, koja doprinosi povećanju utroška energije za umetanje peptida u staničnu membranu [161].

Ovdje je uočeno da se peptidi koji su inicijalno povezani u jedan veliki klaster polako odmiču i difundiraju u polarnoj regiji membrane, uglavnom ostajući kao jedan peptid ili se udružujući u parove tvoreći antiparalelni dimer. Također može se pretpostaviti da agregacija olakšava postavljanje peptida u položaj i konformaciju povoljnu za umetanje, sa strukturom α -uzvojnice i hidrofobnom stranom u kontaktu s hidrofobnom jezgrom membrane.

Stoga, na temelju opaženog međuodnosa između polarnih i hidrofobnih doprinosa, predlaže se sljedeći mehanizam. U srži ponašanja adepantina-1 je njegova amfipatska struktura α -uzvojnice, koja je ugrađena u njegov dizajn. Amfipacitet je dobro poznata značajka AMP-a, ali se o njemu uglavnom raspravlja kao o povoljnom svojstvu za prilagodbu jednog peptida na polarnu i hidrofobnu okolinu membrane [162] [163]. U ovom radu smo se usredotočili na samoasocijacije peptida koje potiče amfipatska struktura. U polarnom okruženju, u vodi ili na površini membrane, samoasocijacija peptida je povoljnija, a agregati su stabilni s polarnom površinom i hidrofobnim aminokiselinama u unutrašnjosti. Međutim, kada se agregat uvlači dublje u membranu, dolazeći u kontakt s hidrofobnom okolinom, hidrofobni ostaci postaju izloženi unutrašnjosti membrane, pri čemu se stabilnost agregata smanjuje, što pak dovodi do odvajanja peptida od agregata.

Međutim, translokacija peptida ili dezintegracija membrane nisu primijećeni niti u atomističkim niti u simulacijama grubog zrna, stoga možemo pretpostaviti da su potrebne veće koncentracije peptida da uzrokuju veće poremećaje membrane, potencijalno dovodeći do probijanja membrane [65]. Osim toga vrijedi napomenuti da prema literaturi polje sile CHARMM daje značajan doprinos visokoj stabilnosti membranskih i peptidno-membranskih sustava, a translokacija ili stvaranje pora nije vjerojatno, za razliku od simulacija s poljem sile OPLS, gdje je veća vjerojatnost opažanja nestabilnosti membrana u interakciji s AMP-ovima [65], [160]. U ovom radu veće koncentracije, odnosno veći P/L omjeri nisu korišteni zbog praktičnih problema vezanih uz ograničenost računalnih resursa. Naime, povećanje broja peptida uzrokuje povećanje njihovih fluktuacija i međusobnih repulzivnih interakcija prije vezanja za membranu, koje katkad, u fiksnoj veličini simulacijske kutije dovode do prelaska pojedinih peptida u njenu periodičku sliku, a posljedično i njihovog vezanja za donji sloj membrane, što simulaciju čini nevaljanom.

Konačno, naponi da se razviju lijekovi temeljeni antimikrobnim peptidima domaćina obično uključuju fino podešavanje različitih strukturnih aspekata koji pridonose aktivnosti s ciljem povećanja baktericidne aktivnosti uz smanjenje toksičnosti [54]. Također su potrebne razne studije kako bi se razvila općenitija slika specifičnih strukturnih i dinamičkih aspekata koji utječu na antimikrobni potencijal i selektivnost. Kao što pokazuju ova i druga istraživanja, moglo bi također biti potrebno razmotriti učinak samoasocijacija u dizajnu AMP-ova [161]. Ovdje prikazani rezultati dobro potvrđuju pravila implementirana u AMP-Designeru, jer dizajnirana amfipatska sekvenca snažno definira molekularne mehanizme adepantina-1. Dodatno, kao što je prikazano na **sl. 46** položaji manjih (Gly i Ala) i većih (Leu) aminokiselina u sekvenci adepantina-1 omogućuju stvaranje udaljenijih (**sl. 46a**) ili bližih (**sl. 46b**) hidrofobnih kontakata, a aminokiselina Glu na C-kraju doprinosi stvaranju antiparalelnog dimera. Stanja na **sl. 46** odgovaraju onima na **sl. 26**.



Slika 46 Prikazi hidrofobnih kontakata u dvopeptidnoj asocijaciji. Slika s lijeve strane je iz simulacije AA-2 i prikazuje kontakte dimera kada je elektrostatički vezan za površinu membrane (stanje na **sl. 26a**). Slika s desne strane je iz CG2AA simulacije koja prikazuje kontakte kada je dimer dublje u membrani (stanje na **sl. 26b**). Udaljenost između osi peptida manja je u slučaju (**b**) (~0.75 nm) nego u slučaju (**a**) (~0.90 nm). Vrpčasti modeli s obojenim aminokiselinama prikazuju peptide, a istaknute su aminokiseline koje sudjeluju u hidrofobnim kontaktima. Glu je istaknut kako bi se bolje vidjela antiparalelna konfiguracija dimera. Kriterij za hidrofobni kontakt je da je bilo koji atom iz jednog ostatka unutar 0.35 nm od bilo kojeg atoma u drugom peptidu.

Istraživanja adepantina su u tijeku, u nedavnoj studiji adepantin-1 modificiran je s tri aminokiselinske supstitucije kako bi se dobio još širi spektar djelovanja protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija uz zadržavanje selektivnosti i niske toksičnosti za zdrave ljudske stanice [164]. Supstitucije su odabrane pomoću alata Mutator [13], a analog adepantina-1 GIKKAVGKALKGLKGLLKALGES-NH₂ (supstituirani ostaci su podebljani) pokazao je poboljšanu antibakterijsku aktivnost u usporedbi s adepantinom-1. Štoviše, adepantin-2 GIGKHVVGKALKGLKGLLKGLGEC-NH₂ s modifikacijom serina u cistein [82] uvršten je kao jedan od kandidata za lijek koji najviše obećava u nedavnom preglednom članku [165].

3.2 Kiadini

Aminokiselinski slijedovi šest kiadina više od 50% su slični sa slijedom *diPGLa-H*. Kiadini -1, -2 i -3 se od *diPGLa-H* razlikuju samo u supstitucijama glicina na jednom ili dva mjesta u primarnom slijedu, dok se kiadini -4, -5 i -6, osim u glicinima razlikuju i u još nekim aminokiselinama (vidi **odjeljak 2.2.1** i **tablicu 2**). Glicini nisu ni polarni ni hidrofobni, kao najmanje aminokiseline oni unose fleksibilnost u konformacije peptida. U ovom dijelu istražuje se kako položaj i broj glicina u aminokiselinskom slijedu mijenja svojstva peptida i utječe na njihovu interakciju s membranom.

Molekularno dinamičkim metodama simulirane su početne faze interakcije kiadina s površinom membrana formiranih od zwitterionskih DLPC fosfolipida (koji modeliraju eukariotsku staničnu membranu) ili POPE i POPG fosfolipida (koji modeliraju anionsku bakterijsku staničnu membranu, omjer miješanja 3:1) [134]. To je prvi korak koji kasnije može dovesti do dubljeg umetanja u membrane i više ili manje učinkovitih litičkih mehanizama. Rezultati simulacija daju mikroskopski uvid u ovu početnu fazu, koja može dati informacije o mogućem mehanizmu/ima djelovanja.

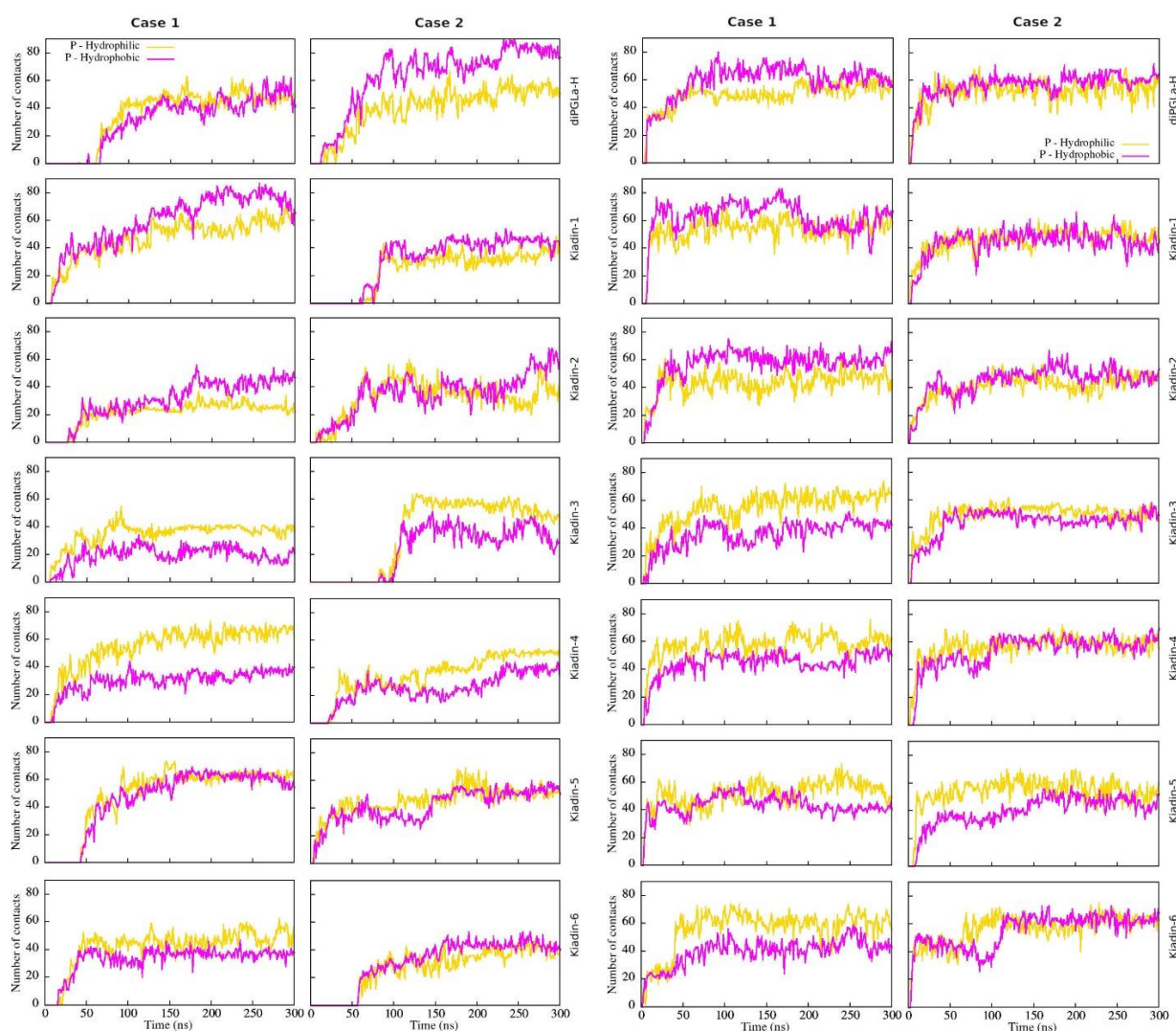
Oba membranska sustava su najprije podvrgnuta simulacijama bez peptida (DLPC 100 ns, POPE:POPG 250 ns) pod istim uvjetima i parametrima koji su korišteni za simulacije u prisutnosti peptida. To je rezultiralo prosječnom površinom po lipidu (APL) od 63.6 \AA^2 za DLPC membranu i 60.4 \AA^2 za POPE:POPG membranu, što je u suglasju sa podacima iz literature od $63.2 \pm 0.5 \text{ \AA}^2$ za DLPC na 300 K [166] i $61.5 \pm 0,2 \text{ \AA}^2$ za POPE:POPG na 310 K [100] .

U simulacijama koje uključuju membrane i peptide primijenjena su umjereno duga vremena simulacija (300 ns) s različitim stranama amfipatskog peptida u početku okrenutim prema površini membrane (polarna strana za *case1* i hidrofobna strana za *case2*, **sl. 11**) kako bi se potpunije dobile informacije o njegovoj interakciji s planarnom membranom u vodenom okolišu. Ispitani su različiti aspekti:

- 1) *Interakcije i kontakti peptida*; praćenjem ukupnog broja kontakata između peptidnih atoma i membranskih P atoma (usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns simulacije) i broja kontakata između atoma lizina i membranskih P atoma (također usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns simulacije);
- 2) *Utjecaj na strukturu peptida*; praćenjem varijacija u sekundarnoj strukturi tijekom simulacija (na temelju dijagrama izračunatih pomoću programa DSSP);
- 3) *Uloga amfipatičnosti peptida*; praćenjem varijacije 3D hidrofobnog momenta od onog na početku (0 ns) do onog na kraju simulacije (300 ns), izračunatog pomoću 3D-HM mrežnog kalkulatora;
- 4) *Pozicioniranje i vezanje peptida*; praćenjem profila gustoće (usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns simulacije) cijelog peptida ili lizina, u odnosu na one za membranske P atome. Ovime se dobivaju informacije o tome kako je peptid smješten na površini membrane, a uz vizualizaciju strukturiranja peptida opisuje i njegovo vezanje.

3.2.1 Interakcije i kontakti peptida

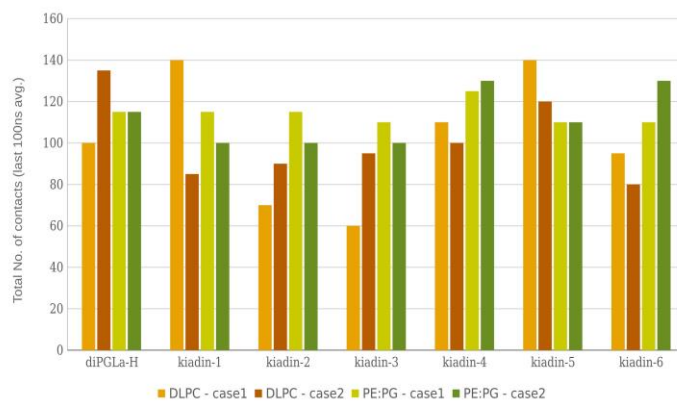
Praćenjem stvaranja kontakata između peptidnih atoma i membranskih fosfatnih atoma, očekivano se uočava da kationski kiadini imaju tendenciju bržeg vezanja i stvaranja više kontakata s anionskom POPE:POPG membranom nego s neutralnom DLPC membranom (sl. 47). Iz prosječnog broja kontakata tijekom zadnjih 100 ns simulacije (sl. 48 i sl. 85 u Prilozima) može se vidjeti da postoje neke iznimke, pri čemu *di*PGLa-H i kiadin-1 i -5 stvaraju više kontakata s neutralnom membranom u nekim simulacijama.



DLPC

POPE:POPG

Slika 47 Broj kontakata kao funkcija vremena između hidrofilnih odnosno hidrofobnih regija peptida i P atoma DLPC (lijevo) i POPE:POPG membrana (desno) određen Gromacsovim programom *mindist*. Korištena je granična udaljenost za kontakte od 0.6 nm. Višestruki kontakti između atoma peptida i jednog P atoma računaju se kao jedan. Svaki red predstavlja podatke o jednom peptidu. Iz dijagrama se može odrediti trenutak vezanja svakog peptida za membranu.



Slika 48 Prosječan broj kontakata između svih atoma koji pripadaju peptidima i fosfatnim atomima membrane usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns simulacije. Za svaki peptid, histogrami pokazuju prosječan broj kontakata za *case1* i *case2* i svaku vrstu membrane, kako je naznačeno.

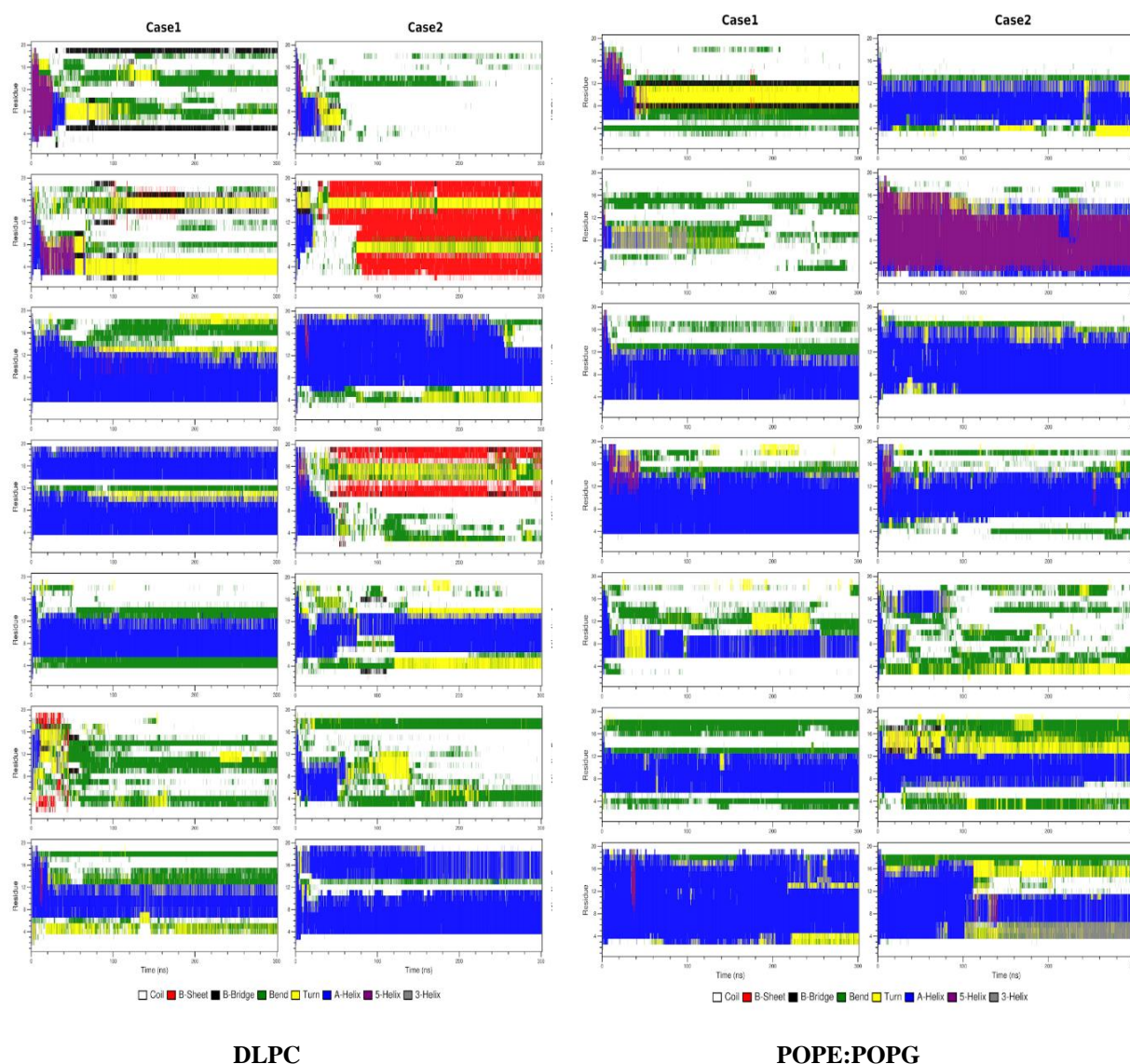
Kontakti koje stvara polarna strana peptida (atomi lizina) s atomima membranskog fosfata također su informativni (sl. 49). Uočava se izražena sklonost da peptidi više stupaju u interakciju s njihovim N-terminalnim krajem, posebno s obzirom na anionsku membranu. Za neutralne membrane postoje iznimke, kao što je kiadin-2.



Slika 49 Prosječan broj kontakata između pojedinačnih atoma lizina i membranskih fosfatnih atoma usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns simulacije određen Gromacsovim programom *mindist*. Korištena je granična udaljenost za kontakte od 0.6 nm. Svaki kontakt između atoma bilo kojeg atoma lizina i bilo kojeg P atoma membrane računa se kao jedan. Prikazani su rezultati za *case1* i *case2* za oba tipa membrane. Lizini su označeni različitim bojama naznačenim ispod histograma.

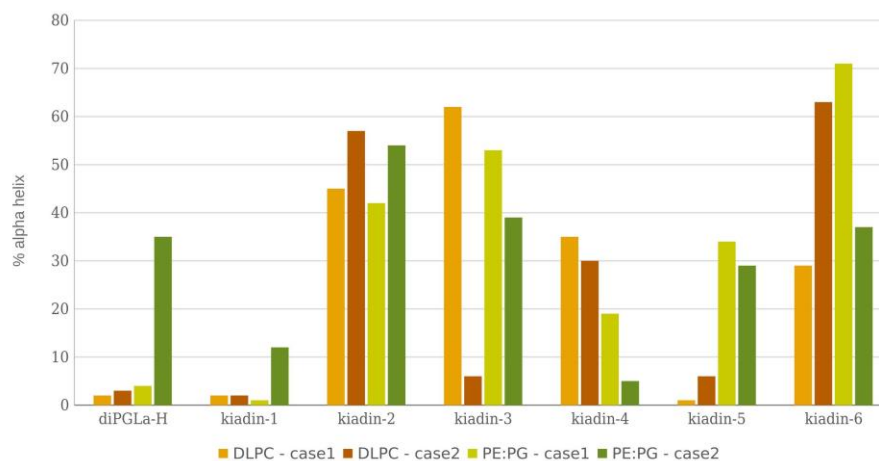
3.2.2 Utjecaj na strukturu peptida

Kiadini pokazuju različite sklonosti prema očuvanju strukture uzvojnice, kao što se može vidjeti na dijagramima napravljenim pomoću programa *DSSP* [128], tijekom simulacija od 300 ns (**sl. 50**). To međutim nije nužno u korelaciji s brojem Gly ostataka prisutnih u sekvenci, za koje bi se očekivalo da će povećati fleksibilnost uzvojnice. Kiadini -2, -3 i -6, s jednim ili dva Gly ostatka na različitim položajima, zapravo su pokazali sveukupno stabilnije strukture od roditeljskog peptida *diPGLa-H*, koji ne sadrži Gly ostatke. U nekim slučajevima, *DSSP* dijagrami pokazuju da ipak dolazi do djelomičnih konformacijskih promjena, sa značajnom prisutnošću uzvojnice tipa π . Čak i četiri zamjene glicinskih ostataka ne moraju nužno smanjiti konformacijsku stabilnost, kao što se može vidjeti kod kiadina-4.



Slika 50 Vremenska evolucija sekundarnog strukturiranja tijekom 300 ns u DLPC (**lijevo**) i POPE:POPG (**desno**) sustavima. Dijagrami su dobiveni pomoću programa *DSSP* [128]. Svaki redak predstavlja podatke za jedan peptid. *DSSP* dodjeljuje tipove sekundarnog strukturiranja za svaki ostatak u peptidu i svaki trenutak, obojen prema legendi koja se nalazi na dnu slike. Početne strukture bile su u obliku α -uzvojnice definirane programom QUARK, dok su konformacije na kraju simulacija prikazane na **sl. 88** i **89**.

Uzimajući u obzir prosječni udio strukture uzvojnice tijekom simulacije od 300 ns (**sl. 51**), *diPGLa-H* i njegov monosupstituirani analog kiadin-1 zapravo su ukupno najmanje stabilni, dok su monosupstituirani analozi kiadini -2 i -6 najstabilniji. Tetra-supstituirani kiadini -4 i -5 pokazuju značajnu ovisnost svoje stabilnosti o vrsti membrane s kojom su u interakciji.

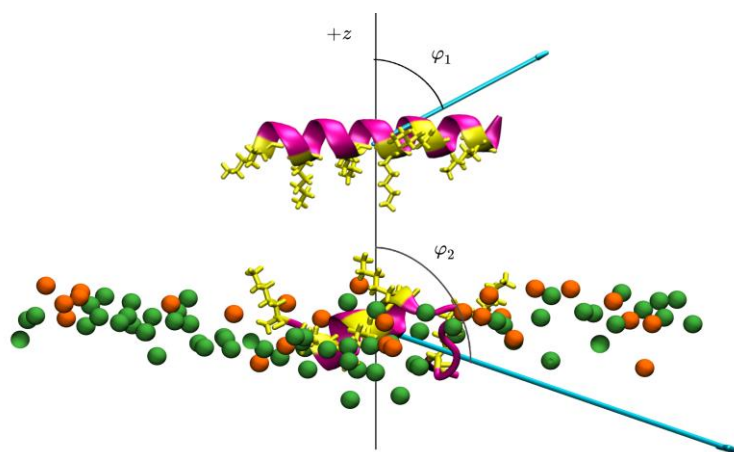


Slika 51 Udio strukture α -uzvojnice za svaki kiadin, usrednjeno tijekom vremena simulacije od 300 ns. Postotak je izračunat korištenjem *DSSP* programa [128]. Podaci za interakciju peptida s DLPC membranom prikazani su narančastom bojom (*case1*) i smeđom (*case2*) bojom, dok su za peptide u interakciji s POPE:POPG membranom prikazani svijetlo zelenom (*case1*) i tamno zelenom (*case2*) bojom.

3.2.3 Uloga amfipatičnosti

U **odjeljku 2.1.1** navedene su vrijednosti 2D hidrofobnog momenta (2D-HM) za sve kiadine. No, HM nije idealna mjera amfipatičnosti, jer se temelji na projekcijama uzvojnice u obliku kruga (**sl. 10**), koje pretpostavljaju savršenu strukturu uzvojnice. 3D hidrofobni moment (3D-HM) [129] određen korištenjem atomskih točkastih naboja i temeljen na prostornoj strukturi peptida realnija je procjena amfipatičnosti.

Na **slici 87** (u Prilozima) prikazana je vizualizacija 3D-HM vektora za sve kiadine u početnim konformacijama u obliku α -uzvojnice (0 ns), a u **tablici 8** nalaze se njihovi iznosi. Uočava se da najmanji iznos 3D-HM vektora u svojoj početnoj konformaciji ima kiadin-5. Prilikom interakcije s membranom 3D-HM se mijenja za sve peptide, pri čemu se iznos vektora često znatno povećava (vidi **tablicu 8** i **sl. 86 - 89**), kao što je ilustrirano na izdvojenom primjeru na **sl. 52** za interakciju kiadina-2 s anionskom membranom (*case1*).



Slika 52 3D hidrofobni moment, izračunat pomoću 3D-HM mrežnog kalkulatora [129]. Gornji dio slike prikazuje kiadin-2 iznad membrane na 0 sekundi (odmah nakon ekvilibracije), s orijentacijom *case1*, a donji dio nakon 300 ns u interakciji s POPE:POPG membranom. Fosfolipidi su predstavljeni samo P atomima (zeleno i narančasto za POPE i POPG). Vektori 3D hidrofobnog momenta za oba slučaja predstavljeni su tirkiznim strelicama, čija duljina odgovara njihovim izračunatim modulima (vidi **tablicu 8**), a kutovi φ_1 i φ_2 između normale na površinu membrane (+z-os) i vektora definiraju njihov smjer. Prikazi za druge peptide prikazani su na **sl. 87 - 89**).

To se događa iako se dielektrična konstanta smanjuje četiri puta pri prelasku iz svog početnog stanja u vodenoj otopini ($D_e = 78.54$) u manje polarnu regiju površine membrane (procijenjena konstanta $D_e \sim 20$) [129], i sugerira da peptidi mogu prilagoditi svoju strukturu za povećanje amfipatičnosti pri interakciji s membranom. Bez obzira na konformaciju peptida, 3D-HM vektor se uvijek usmjerava prema najmanje polarnom dijelu peptida.

U većini slučajeva, orijentacija 3D-HM vektora na kraju simulacije usmjerena je od membrane prema otopini, što sugerira da je polarna strana peptida više u kontaktu s površinom membrane, čime se stvara povoljan elektrostatski dipol za početnu interakciju. Ovo je osobito slučaj kod interakcije s anionskom membranom (kut $\varphi \sim 50^\circ - \sim 85^\circ$, **tablica 8**). Promjene u nagibu 3D-HM vektora izraženije su i variraju u interakciji s neutralnom membranom (kut $\varphi \sim 30^\circ - \sim 170^\circ$). Iznos

vektora je u prosjeku veći kada dođe do interakcije s anionskom membranom (prosječni 3D-HM ~ 45 kTÅ/e za POPE:POPG u odnosu na ~ 33 kTÅ/e za DLPC), ali sa značajnim varijacijama ovisno o peptidu i njegovoj početnoj orijentaciji (*case1* ili *case2*) (**tablica 8**).

Tablica 8 Iznos 3D-HM vektora i kut između 3D-HM vektora i +z osi (os okomita na površinu membrane), izračunato za stanja u 0 ns i 300 ns.

	Modul 3D-HM vektora [$\text{\AA}kT/e$]				Kut između 3D-HM vektora i +z osi [$^\circ$]						
		<i>case1</i>	<i>case2</i>	<i>case1</i>	<i>case2</i>	<i>case1</i>	<i>case2</i>	<i>case1</i>	<i>case2</i>	<i>case1</i>	<i>case2</i>
	H ₂ O	PE:PG		DLPC		H ₂ O		PE:PG		DLPC	
Vrijeme [ns]	0	300				0		300			
Diel. konst.	78.54	20				78.54		20			
<i>diPGLa-H</i>	23,5 ± 0,5	42.7	41.1	13.7	68.7	64,9 ± 0,1	115,3 ± 1,0	73.3	49.8	29.8	100.4
kiadin-1	18,1 ± 0,7	12.4	69.5	27.4	18.1	70,5 ± 1,1	108,8 ± 1,2	103.2	84.7	79.7	107.2
kiadin-2	23,2 ± 0,9	46.2	67.1	37.0	52.7	67,3 ± 0,9	113,7 ± 0,7	110.1	73.1	166.7	104.0
kiadin-3	23,9 ± 0,9	44.6	39.8	38.2	37.9	63,5 ± 0,8	115,6 ± 0,2	58.2	66.6	89.0	76.4
kiadin-4	20,2 ± 0,4	27.8	25.5	47.8	34.9	56,1 ± 0,6	122,5 ± 1,5	82.1	55.6	64.9	72.6
kiadin-5	16,3 ± 0,8	64.3	27.1	20.7	22.0	73,0 ± 1,1	107,9 ± 0,9	81.1	73.5	62.6	49.6
kiadin-6	20,2 ± 0,7	65.2	49.9	26.0	20.3	60,8 ± 0,1	119,9 ± 1,7	67.8	85.4	134.7	25.6

3.2.4 Pozicioniranje i vezanje peptida

Površinsko vezanje kiadina na neutralne ili anionske membrane može se prikazati pomoću profila gustoće (**sl. 53 - 56**) koji uspoređuju distribuciju atoma peptida (crna krivulja) ili atoma lizina (žuta krivulja) u odnosu na površinu dvosloja (predstavljeno distribucijom P atoma, plava krivulja). Kao što je već navedeno, *diPGLa-H* gubi strukturu α -uzvojnice s vremenom i uglavnom se nalazi na površini membrane tijekom simulacije. Samo djelomično zadržava strukturu u srednjem području kada je hidrofobnom stranom u interakciji s anionskom membranom (**sl. 56 case2**).

Kiadin-1, s jednom Gly supstitucijom u C-terminalnom području, pokazuje slično ponašanje, a destabilizacija konformacije uzvojnice očita je u većini slučajeva. U interakciji hidrofobnom stranom s anionskom membranom zauzima strukturu π -uzvojnice (53%), s neutralnom membranom preuzima kompaktnu strukturu sastavljenu od β -lanaca (49%). Peptid ulazi duboko u polarnu regiju anionske membrane, kao što se vidi u profilima gustoće.

Kiadin-2, s jednom Gly supstitucijom u N-terminalnom području, pokazuje veću konformacijsku stabilnost koja manje ovisi o vrsti membrane i orijentaciji pristupa, održavajući > 40% strukture α -uzvojnice, u prosjeku, za sve simulacije (**sl. 50 i 51**). To, međutim, ne dovodi do više kontakata s membranskim fosfatnim atomima, i za razliku od većine drugih peptida, on ne stupa u interakciju s DLPC membranskim fosfatima prvenstveno sa svojim N-terminalnim Lys ostacima, nego se značajno preorijentira, i iako nije ušao dublje u membranu, to može biti prvi korak prema

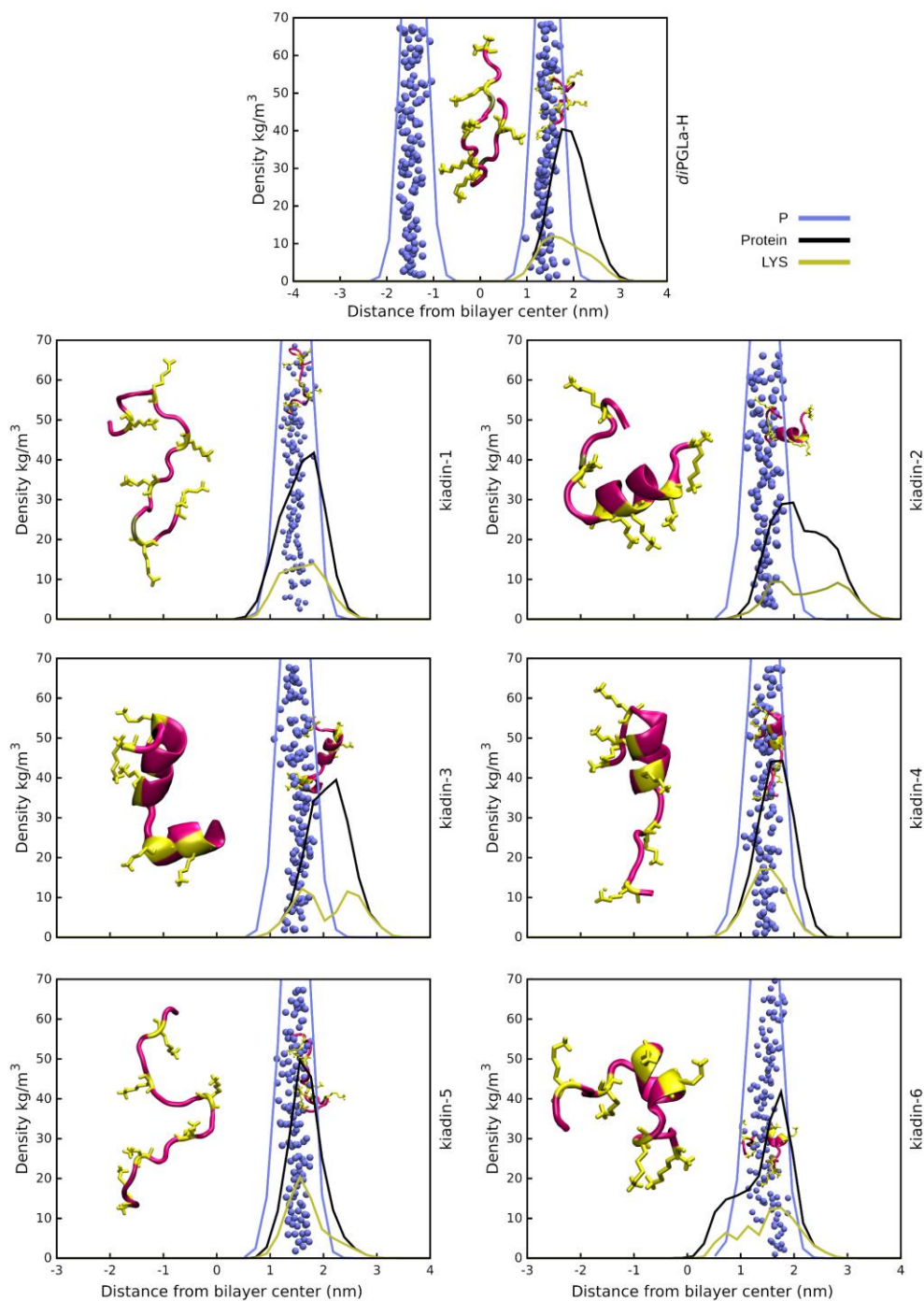
naknadnom umetanju. Nasuprot tome, u interakciji s anionskom membranom peptid ulazi prilično duboko u membranu, s manjim nagibom. Vizualni pregled (vidi konačne konformacije na **sl. 53 - 56**), kao i varijacija u 3D-HM koji se povećava i, u većini slučajeva, usmjerava prema površini membrane, sugerira mogući mehanizam vezivanja u dva koraka. N-terminalni segment se razmotava i ulazi na površinu, povlačeći peptid u polarno područje i okrećući ga kako bi izložio hidrofobnu stranu prema dvosloju, ostavljajući polarni sektor u kontaktu s negativnim nabojem membrane.

Kiadin-6 također ima jednu Gly supstituciju u položaju bliskom onom kiadina-1, ali se ponaša više kao kiadin-2, održavajući više od 30% strukture uzvojnice u svim simulacijama, iako je prilično narušene strukture pri vezanju na obje vrste membrana. Varijacije 3D-HM-a sugeriraju sličnu promjenu orijentacije kao kod kiadina-2 nakon što peptid počne ulaziti u DLPC membranu.

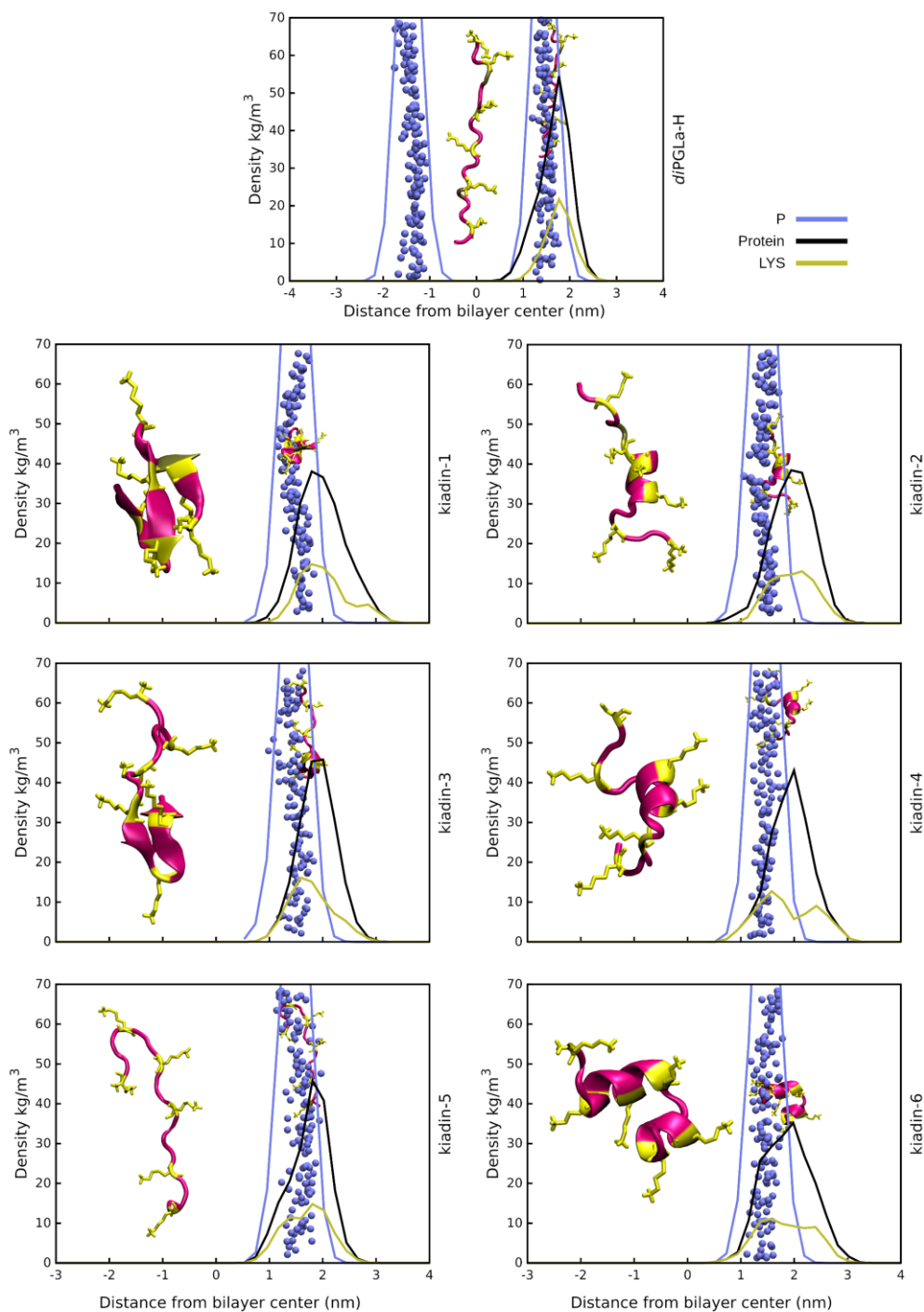
Kiadin-3, s dvije Gly supstitucije, zadržava određenu stabilnost strukture uzvojnice u svim slučajevima, manje od kiadina-2, ali više od kiadina-1. U interakciji s neutralnom membranom, promjena konformacije izrazito ovisi o početnoj orijentaciji, tako da dolazi do destabilizacije središnje regije u *case1*, slično kiadinu-6, i prijelaz u β -ukosnicu za *case2*, slično kiadinu-1.

Kiadin-4, koji ima četiri Gly supstitucije, zadržava veću konformacijsku stabilnost u interakciji s neutralnom DLPC membranom nego u kontaktu s anionskom POPE:POPG membranom, u interakciji s kojom se potpuno razmotava. Koliko se može vidjeti, ne ulazi duboko ni u jednu membranu. Nasuprot tome, kiadin-5 s drugačijim uzorkom 4 Gly supstitucije, potpuno se razmotava kada se veže na DLPC membranu, dok zadržava dijelove strukture α -uzvojnice u kontaktu s anionskom membranom. Unatoč tome, ne ulazi duboko ni u jednu membranu.

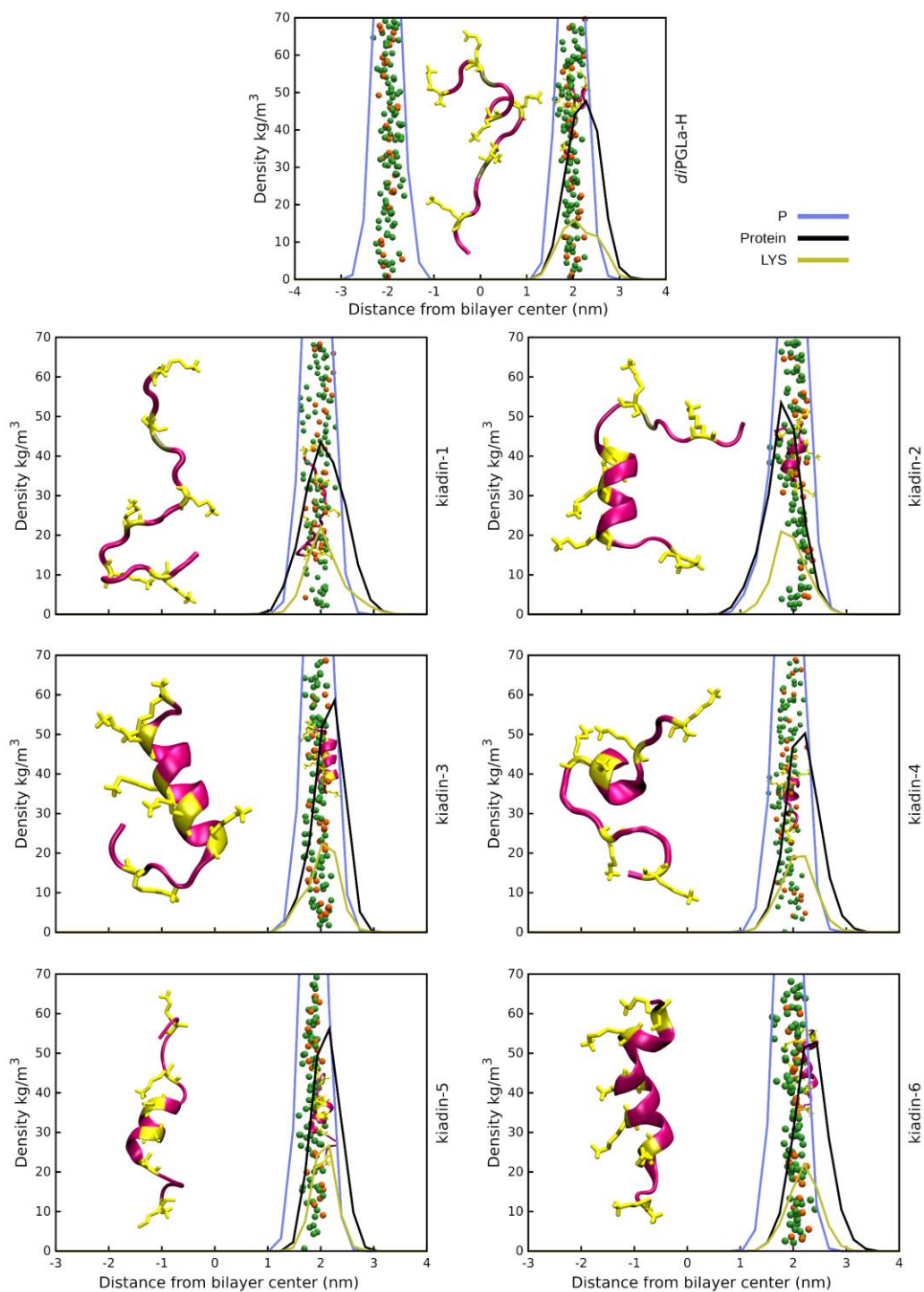
Na **sl. 53 - 56** prikazani su profili gustoće za simulacije kiadina s DLPC i POPE:POPG membranom (*case1* i *case2*), usrednjeni tijekom zadnjih 100 ns simulacije. Crne krivulje predstavljaju raspodjelu mase svih atoma u peptidu, a plave krivulja raspodjelu mase atoma fosfora koji predstavljaju površinu mebranskog dvosloja. Žute krivulje prikazuju distribuciju lizina. Raspodjela atoma fosfora za oba sloja membrane prikazana je samo za *diPGLa-H*. Na 300 ns (kraj simulacije) napravljena je snimka strukture, koja je prikazana i na površini membrane (manja struktura) i pomaknuta u stranu, radi bolje preglednosti (veća struktura).



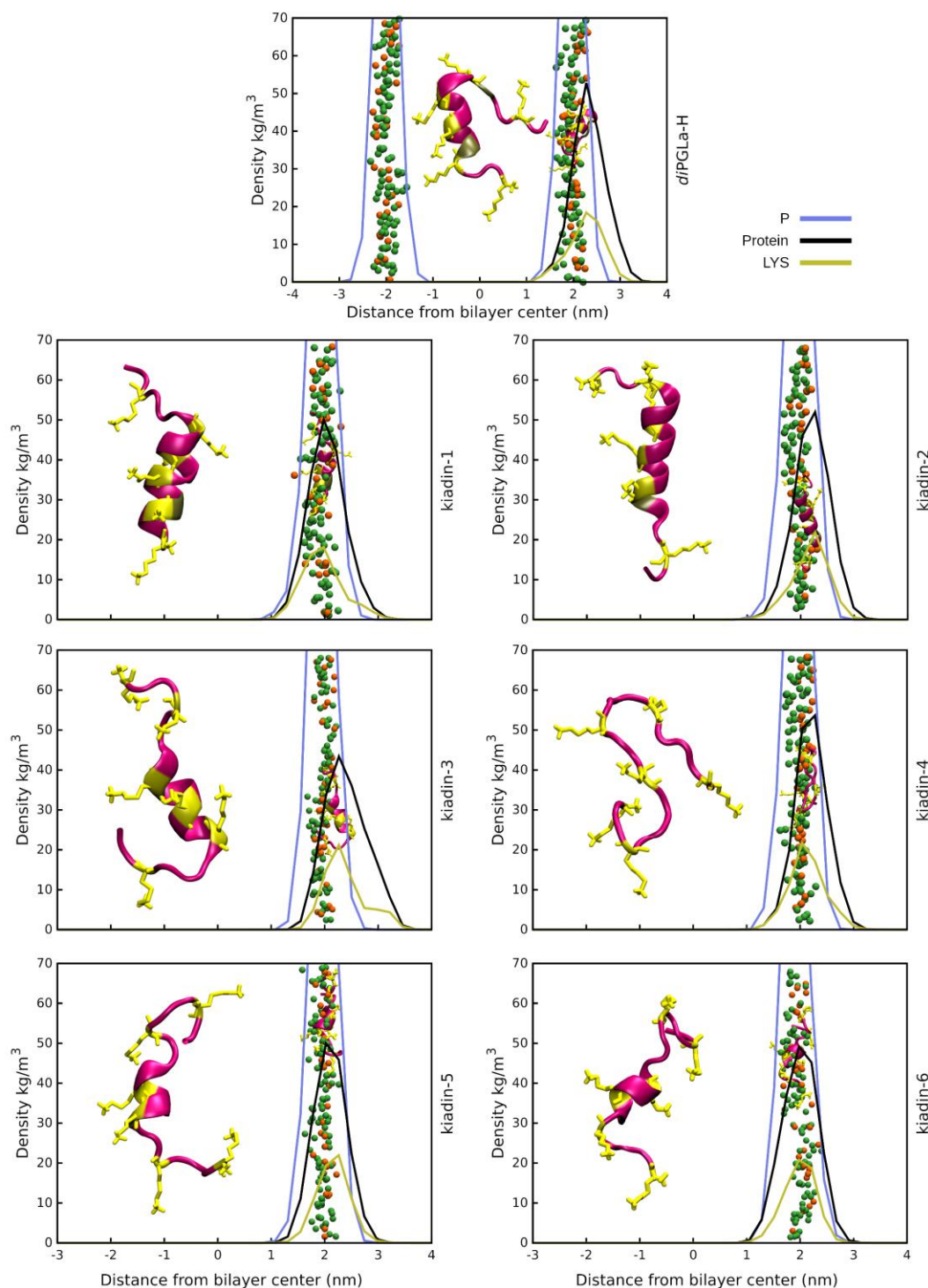
Slika 53 Profili gustoće za simulacije kiadina s DLPC membranom (*case1*), usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns i konformacije peptida na kraju simulacija u trenutku 300 ns. Peptidi su prikazani vrpčama i štapićima sa hidrofobnim ostacima u magenta i nabijenim ostacima u žutoj boji, a P atomi DLPC lipida prikazani su plavim kuglicama.



Slika 54 Profili gustoće za simulacije kiadina s DLPC membranom (*case2*), usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns i konformacije peptida na kraju simulacija u trenutku 300 ns. Peptidi su prikazani vrpčama i štapićima sa hidrofobnim ostacima u magenta i nabijenim ostacima u žutoj boji, a P atomi DLPC lipida prikazani su plavim kuglicama.



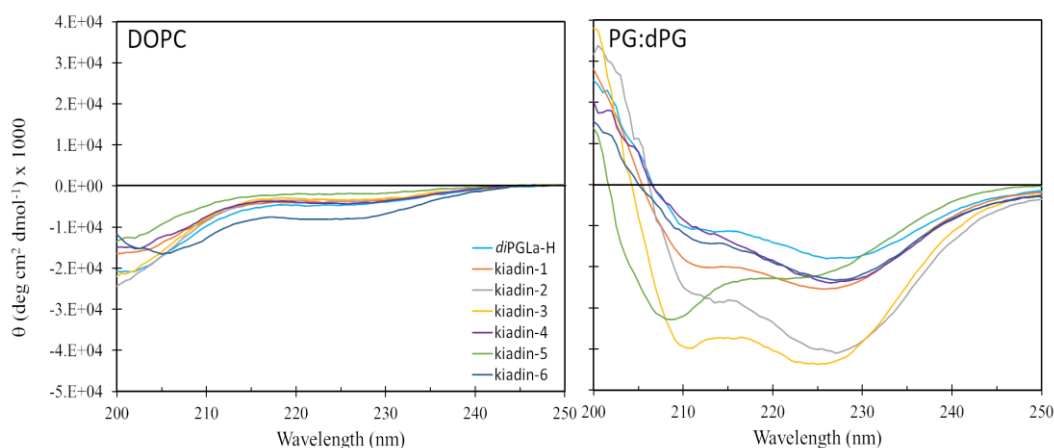
Slika 55 Profili gustoće za simulacije kiadina s POPE:POPG membranom (*case1*), usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns i konformacije peptida na kraju simulacija u trenutku 300 ns. Peptidi su prikazani vrcama i štapićima sa hidrofobnim ostacima u magenta i nabijenim ostacima u žutoj boji, a P atomi lipida su prikazani zelenim (POPE) i narančastim (POPG) kuglicama.



Slika 56 Profili gustoće za kiadin peptide s POPE:POPG membranom (*case2*) usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns i konformacije peptida na kraju simulacija u trenutku 300 ns. Peptidi su prikazani vrcama i štapićima sa hidrofobnim ostacima u magenta i nabijenim ostacima u žutoj boji, a P atomi lipida su prikazani zelenim (POPE) i narančastim (POPG) kuglicama.

3.2.5 Strukturna stabilnost kiadina određena CD spektroskopijom i površinskom plazmonskom rezonancijom⁵

Strukturalne varijacije uočene tijekom MD simulacija uspoređuju se s eksperimentalno određenim konformacijama utvrđenim CD spektroskopijom, u prisutnosti neutralnih *1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfoholine* (DOPC) ili anionskih *phosphatidylglycerol:diphosphatidylglycerol* (PG:dPG) liposoma. Pri tome treba imati u vidu da eksperimentalni podaci uzimaju u obzir mnogo kasniju fazu interakcije s membranom, a osim toga uzorkuju ne samo peptide vezane na membranu nego i one nevezane, u otopini. Utvrđeno je da su u vodenoj otopini kiadini i *diPGLa-H* razmotani, odnosno ne poprimaju sekundarnu strukturu uzvojnice [54]. CD spektri s neutralnom membranom pokazuju da većina peptida ili ne interagira u značajnoj mjeri ili u slučaju interakcije ne poprima strukturu uzvojnice (< 10%), budući da se opažaju samo male razlike u odnosu na peptide u vodenoj otopini. Jedina iznimka je kiadin-6 sa ~20% strukturom uzvojnice (sl. 57).



Slika 57 CD spektri kiadina u prisutnosti neutralnih (DOPC [Rončević T. i drugi, rad u pripremi]) i anionskih (PG:dPG [54]) LUV-ova. Spektri su rezultat tri skeniranja provedena s 20 μM koncentracijom peptida. Spektri pokazuju nestrukturiranje kiadina u DOPC i izraženo strukturiranje u PG:dPG membrani [167] [168].

Nasuprot tomu, izraženo strukturiranje opaženo je kod CD-a u prisutnosti anionskih PG/dPG LUV-ova (sl. 57). Ovo sugerira da dolazi do jake interakcije s anionskom membranom na način koji rezultira dobro definiranom strukturom. Međutim, s iznimkom kiadina-5, svi spektri značajno odstupaju od onih očekivanih za kanonsku konformaciju α -uzvojnica koja pokazuje karakteristične minimume na valnim duljinama od 208 i 222 nm i omjer $\theta_{222} : \theta_{208} \approx 1$ [169], [167]. Moguća objašnjenja za izmijenjene spektre mogla bi biti formiranje drugih tipova konformacije uzvojnica (npr. 3_{10} - ili π -uzvojnica [170]) ili agregacija peptidnih uzvojnica [111], na koje upućuje omjer $\theta_{222} : \theta_{208} > 1$. Stoga je moguće procijeniti sadržaj α -uzvojnica iz CD spektra samo za kiadin-

⁵ U ovom odjeljku rezultati simulacija su, osim sa CD spektrima iz članka Rončević T. i drugi [54], uspoređeni i s eksperimentalnim rezultatima (CD i SPR, vidi odjeljak 2.2.3) proizilim iz kolaboracije Rončević T., Maleš M., Sonavane Y., Guida F., Pacor S., Tossi A., Zoranić L., rad u pripremi.

5 (~50%), za ostale peptide može se samo pretpostaviti da kiadini -2 i -3 interagiraju jače s anionskom membranom nego kiadini -1, -4 ili -6, što dovodi do njihove stabilnije konformacije koja, međutim, značajno odstupa od one kanonske α -uzvojnice, dok *diPGLa-H* ima najslabiju interakciju.

Iako MD simulacije uzorkuju samo početne faze interakcije peptida s membranama, rezultati su u skladu s gore opisanim CD spektrima (vidi **sl. 50** i **51**). Simulacije pokazuju da u prisutnosti anionske membrane peptidi poprimaju konformacije koje u određenoj mjeri odstupaju od kanoničke zavojite. S obzirom na neutralnu membranu, MD simulacije, poput odgovarajućih CD spektara, sugeriraju da peptidi općenito nemaju snažnu interakciju, ostajući na njezinoj površini. Postoje dva moguća objašnjenja za uvide iz CD-a, uzimajući u obzir da se peptidi nalaze između dva okruženja, otopine i membrane. Jedno je da peptidi interagiraju s obje membrane, ali samo one anionske induciraju njihovo strukturiranje. Drugo je da većina peptida stupa u interakciju s anionskom membranom na način koji mijenja njihovu konformaciju, ali samo manjina peptida ulazi u neutralne membrane, tako da se konformacijski učinci na peptidima vezanim za njih ne mogu detektirati. Interakcije peptida s neutralnim membranama stoga su ispitane alternativnim metodama, kao što je površinska plazmonska rezonancija (engl. *surface plasmon resonance*, SPR), koja daje informacije samo o peptidima koji su vezani na membranu (vidi **odjeljak 2.2.3**).

Rezultati SPR-a potvrđuju da peptidi pokazuju različita ponašanja obzirom na vezanje na neutralne DOPC LUV-ove (**sl. 90** u Prilozima). U svim koncentracijama matični peptid *diPGLa-H* i kiadin-3 sa dvije supstitucije glicina, ponašaju se slično, vrlo brzo se vežu za membranu pri čemu dodavanje novih peptida ne pojačava signal što znači da vrlo brzo dolazi do zasićenja. Kiadin-2, sa jednom supstitucijom glicina blizu N kraja, ponaša se slično do koncentracije 8 μM , ali pri najvišoj korištenoj koncentraciji, nakon brzog vezanja počinje narušavati integritet LUV-a. Kiadin-1, s jednom supstitucijom glicina blizu C kraja, ima sličan afinitet za vezanje u koncentracijama do 4 μM , no u većim koncentracijama (8 i 16 μM) dolazi do jakog povećanja signala uz izostanak zasićenja, što sugerira različit tip interakcije koji moguće uključuje agregaciju peptida na membrani, a primjetno je i sporije odvajanje peptida od membrane pri ispiranju puferom. Kiadin-6 koji također ima jednu supstituciju glicina, pokazuje najjače povećanje signala pri vezanju peptida, sugerirajući visok afinitet za neutralne LUV-ove, što je u skladu s uvidima iz CD spektroskopije, pri čemu ne dolazi do zasićenja što također sugerira agregaciju peptida vezanih na membranu čak i pri niskim koncentracijama. Kiadin 4, sa četiri supstitucije glicina, pri najvećoj koncentraciji (16 μM) pokazuje značajan udio ireverzibilnog vezanja što ukazuje na moguću translokaciju u vezikule. Kiadin-5, koji također ima četiri supstitucije glicina (na različitim mjestima u odnosu na kiadin-4) pokazuje najmanji afinitet za neutralne DOPC vezikule što je također u skladu sa rezultatima CD-a.

3.2.6 Diskusija

Kao familija peptida sa $\geq 50\%$ identičnih ostataka (vidi **odjeljak 2.2.1**), kiadini i *diPGLa-H* predstavljaju konzistentan skup sekvenci za istraživanje učinka Gly supstitucija na strukturne karakteristike AMP-ova u obliku uzvojnice i mehanizam djelovanja prema membranama, odnosno na moduliranje antimikrobne aktivnosti i toksičnosti.

MD simulacije pokazuju da svi kiadini brzo stupaju u interakciju s anionskom i neutralnom membranom, mijenjajući pri tome svoje konformacije, ponekad se potpuno razmotavaju ili pak poprimaju iskrivljene konformacije uzvojnice ili druge vrste konformacija. Očito je da neki nastoje prilagoditi svoje strukture kako bi povećali svoje hidrofobne momente na način koji možda pomaže naknadno umetanje u lipidni dvosloj. Međutim, čini se da način na koji to rade jako ovisi o vrsti membrane. Nadalje, rezultati sugeriraju da u ranim fazama interakcije s površinom membrane peptidi poprimaju razmotane konformacije, koje mogu postupno prijeći u oblik uzvojnice koji podržava umetanje u membranu, ali mogu poprimiti i druge vrste konformacija s povoljnim 3D hidrofobnim momentima.

S obzirom na vrstu Gly supstitucije, uzeti zajedno, rezultati simulacija pokazuju da njihov učinak na strukturnu stabilnost značajno ovisi o njihovom položaju i vrsti membrane s kojom stupaju u interakciju (neutralna ili anionska), ali ne nužno o broju zamjena.

U svakom slučaju, svi kiadini pokazuju konformacijske promjene u prisutnosti anionskih LUV-ova, kao što je eksperimentalno pokazano CD spektrima (**sl. 57**), sugerirajući da se u kasnijim fazama umeću u bakterijske dvosloje u dobro definiranoj konformaciji. Međutim, za većinu peptida (kiadin-5 je iznimka), čini se da ova konformacija značajno odstupa od kanonske α -uzvojnice. Činjenica da je kiadin-5, koji poprima konformaciju kanonske α -uzvojnice u prisutnosti anionskih LUV-ova, najmanje aktivan na bakterije (vidi **odjeljak 2.2.1** i **tablicu 3**), daje dvije važne indikacije: *i*) snažna antimikrobna aktivnost ne ovisi o sposobnosti peptida za vezanje na bakterijsku membranu i umetanje u nju, već o naknadnim koracima koji dovode do oštećenja membrane i *ii*) da je vrsta konformacijske promjene, a ne razmjera, ona koja određuje antimikrobni potencijal. U tom pogledu čini se da kiadin-5 stupa u interakciju s membranom kao strukturirani peptid u obliku α -uzvojnice, ali vjerojatno ne dolazi do agregacije i ne uzrokuje njezin poremećaj, pa je relativno neaktivan. CD spektri antimikrobno aktivnijih kiadina u prisutnosti anionskih vezikula, za razliku od toga, ukazuju na značajno odstupanje od konformacije α -uzvojnice, moguće zbog udruživanja peptida u klastere, što bi moglo biti važno za njihov mehanizam antimikrobnog djelovanja.

S obzirom na neutralne vezikule, zanimljivo je da CD spektri ukazuju na prijelaz prema konformaciji uzvojnice samo za kiadin-6. Svi ostali peptidi pokazuju nizak postotak strukture uzvojnice (kiadin-5 pokazuje najmanji), što bi sugeriralo da ne stupaju u snažnu interakciju s ovom vrstom membrane, iako su neki prilično citotoksični za cirkulirajuće krvne stanice. Ovo je prilično različito od jasnog strukturiranja koje se događa u prisutnosti anionskih LUV-ova. Postoje dvije

moгуćnosti, ili se kiadini umeću u neutralne membrane bez poprimanja konformacije zavojnice, što je malo vjerojatno, ili se, obzirom da su CD spektri složeni rezultat svih konformacija prisutnih u populaciji peptida, ravnoteža pri vezanju postiže tako da veći dio peptida ostaje u otopini a manji dio površinski vezan. U ovom bi slučaju većina peptida ostala nestrukturirana i njihov bi doprinos CD spektru nadmašio udio peptida koji se umeću u membranski dvosloj, gdje vjerojatno poprimaju neki oblik zavojite konformacije. Čini se da se samo za kiadin-6 znatniji udio populacije peptida tako ponaša. To bi sugeriralo da citotoksično ponašanje kiadina proizlazi iz relativno niskog udjela peptida koji se umeću u neutralne membrane eukariotskog tipa (prema CD spektrima procjenjuje se na < 10% za većinu kiadina). Stoga treba biti oprezan pri korištenju CD spektra u prisutnosti neutralnih LUV-ova za predviđanje citotoksičnosti AMP-a ili izostanka iste. Prikladno je nadopuniti ih mjerenjima kao što je SPR, koja ispituju samo populaciju peptida vezanu na membranu, i koja mogu razlikovati različite vrste vezanja.

Rezultati SPR-a (sl. 90 u Prilozima) otkrivaju da svi kiadini imaju brzu kinetiku vezanja s neutralnim LUV-ovima, što ukazuje na dobru sposobnost prijanjanja na površinu membrane. S druge strane senzogrami imaju značajno različite koncentracijske profile, što ukazuje na različite mehanizme interakcije odnosno umetanja. U nekim slučajevima se veći udio peptida samo reverzibilno veže sa ili bez udruživanja, u drugim slučajevima je prisutan veći udio ireverzibilno vezanih peptida što sugerira translokaciju većeg broja peptida u vezikulu, dok je u slučaju kiadina-2 došlo i do narušavanja integriteta vezikule. Radi se dakle o širokom spektru različitog ponašanja skupine peptida koji se razlikuju u tek nekoliko aminokiselina u sekvenci. SPR studije pokazuju da kiadin-5 ima najmanji afinitet vezanja/umetanja, a kiadin-6 najveći, što je u skladu s njihovim CD spektrima, a također je u korelaciji s time da su najmanje odnosno najviše citotoksični za stanice domaćina (**tablica 3**).

Vjerojatno najzanimljiviji aspekt učinka Gly-supstitucija na biološke aktivnosti kiadina su izrazito različiti efekti koje oni mogu imati na antimikrobni potencijal u odnosu na toksičnost prema stanicama domaćina. U ranijim radovima je navedeno kako prisutnost i smještaj Gly supstitucija u dizajniranim sekvencama AMP-ova u obliku uzvojnice može značajno utjecati na njihovu antimikrobnu moć i selektivnost [171], [82]. Posebno je istaknuto da na antimikrobnu potenciju utječe više mjesto nego broj zamjena, te da općenito više utječe na aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama ili citotoksičnost nego na aktivnost prema Gram-negativnim mikroorganizmima. Ovaj rad u određenoj mjeri potvrđuje ova zapažanja, iako pokazuje koliko odnos može biti složen. Jedna supstitucija glicina u kiadinu-1 neznatno pomaže antimikrobnoj potentnosti bez značajnog utjecaja na antimikrobnu selektivnost ili citotoksičnost, dok supstitucija glicina na različitom položaju u kiadinu-2 pogoduje aktivnosti protiv Gram-negativne bakterije i smanjuje citotoksičnost, ali nauštrb smanjene potentnosti protiv Gram-pozitivnih bakterija (**tablica 3**). Ovo sugerira da konformacijske promjene izazvane glicinom ne samo da mogu utjecati na način na koji peptid stupa u interakciju s membranama, već i na to kako im se približava kroz prilično različite vanjske slojeve Gram-pozitivnih (gusti peptidoglikanski sloj) i Gram-negativnih bakterija (vanjska membrana s lipopolisaharidima). Za kiadin-6, pojedinačna Gly supstitucija ne

samo da smanjuje ukupnu antimikrobnu moć, već također značajno povećava citotoksičnost, što je još izraženije kod četverosturko supstituiranog kiadina-4 (tablica 3)

Ova studija stoga daje neke odgovore o tome kako supstitucije glicina utječu na interakciju linearnih AMP-ova u obliku uzvojnice s biološkim membranama i kako to pridonosi njihovom načinu djelovanja i biološkim aktivnostima. Također otvara nova pitanja o procesu koji je naizgled mnogo složeniji nego što se u početku pretpostavljalo. Kombinirana uporaba *in silico*, biofizičkih i *in vitro* metoda može biti ključ uspješnog dizajna novih antiinfektivnih sredstava počevši od AMP-a, s obzirom na to da ovaj proces do danas nije bio dovoljno uspješan, unatoč desetljećima predanog istraživanja.

3.3 Anisaxin-2S

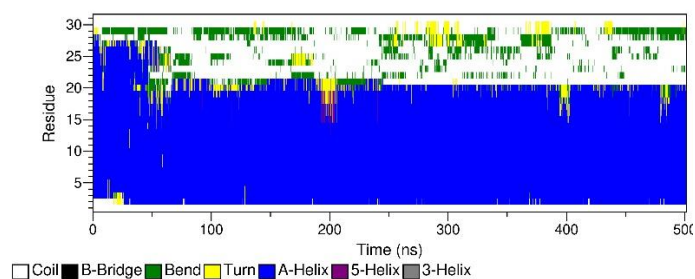
Otkrivanje mehanizma djelovanja antimikrobnih peptida i dalje ostaje izazov, unatoč brojnim istraživanjima. Kombinacije makroskopskih eksperimenata kojima se određuje bioaktivnost, na primjer mjerenjem MIC odnosno MBC vrijednosti ili hemolize, zatim tehnika oslikavanja poput AFM-a i fluorescentnog mikroskopa, i drugih, daju rezultate iza kojih stoji mikroskopski mehanizam nedostupan takvim vrstama eksperimenata. Do neke mjere na mehanizam mogu ukazivati CD spektri koji opisuju strukturu peptida i položaje u odnosu na membranu [172], SPR tehnike kojom se proces vezanja peptida s membranom može pratiti u realnom vremenu, u novije vrijeme ssNMR (engl. *solid state nuclear magnetic resonance*) [173] itd. No, uz sve to, MD simulacije ostaju jedinstven izvor atomističkih detalja načina djelovanja AMP-a, iako pristupaju manjim vremenskim skalama (reda nano ili mikrosekundi) od stvarne dinamike procesa i ograničene su opisima polja sile i algoritmima numeričkog modeliranja.

Općenito interakcija peptida s membranom, odnosno njena eventualna dezintegracija u obliku pore ili translokacija peptida, odvija se u tri faze: početno vezanje i akumulacija peptida na površini membrane, nakon čega slijedi strukturiranje i reorijentacija peptida koja omogućava umetanje peptida u unutrašnjost membrane odnosno njegovu translokaciju ili stvaranje pore. Obzirom da se ovakvi procesi odvijaju na mnogo većoj vremenskoj skali od one koja je izvediva MD simulacijama, koriste se različiti pristupi usmjereni na promatranje pojedinačnih koraka kako bi se dobile informacije o mehanizmu djelovanja [67], primjerice promatranje samo procesa vezanja peptida ili stabilnosti pora, pri čemu početne konfiguracije modeliraju konačno stanje pojedinačnog koraka, pa se tako peptidi postavljaju u konformaciji uzvojnice blizu površine membrane ili se umeću u membranu tvoreći strukturu pore.

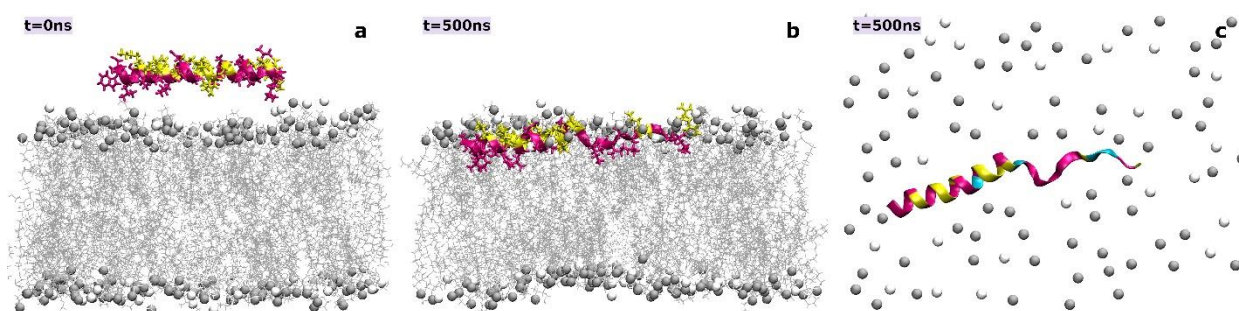
U ovom dijelu atomističkim simulacijama ispituje se mogućnost ostavarivanja ekstrakcije lipida pri interakciji peptida s membranom, fenomen uočen u eksperimentima i krupnozrnatim simulacijama melitina u interakciji s neutralnom membranom [78]. Inicijalne konfiguracije sastoje se od strukturiranih peptida vezanih za površinu membrane ili u njenoj neposrednoj blizini. Interakcije se ispituju postavljanjem različitih peptid – lipid (P/L) omjera. Studija uključuje simulacije s 1) jednim, 2) šest, 3) dvanaest i 4) dvadeset i četiri peptida u interakciji s POPE:POPG i POPC membranama, s P/L omjerima 1/256, 1/128, 1/64 i 1/32 respektivno (vidi **tablicu 4**).

3.3.1 Simulacija s jednim peptidom, P/L=1/256.

Kod interakcije jednog anisaxina-2S s POPE:POPG membranom uočava se očuvanost dijela sa strukturom α -uzvojnice od N terminala do Gly²¹ i fleksibilnost ostatka (sl. 58 i 59) što je nagoviješteno u modelima predviđenim QUARK-om (odjeljak 2.3.1). Ovakvo mijenjanje strukture u okolišu glicina rezultira fleksibilnijom prilagodbom peptida membranskom okolišu. Nakon početnog elektrostatskog vezanja peptida paralelno s membranom, najprije se hidrofobni Trp² i Leu³ na početku i Leu³⁰ na kraju peptida umeću dublje u membranu. Okretanje ostalih hidrofobnih ostataka prema membrani omogućuje se pomenutom fleksibilnošću C terminalnog dijela i izdizanjem središnjeg dijela peptida tijekom okreta. Za vrijeme simulacije (0.5 μ s) ne opažaju se promjene u strukturi membrane.



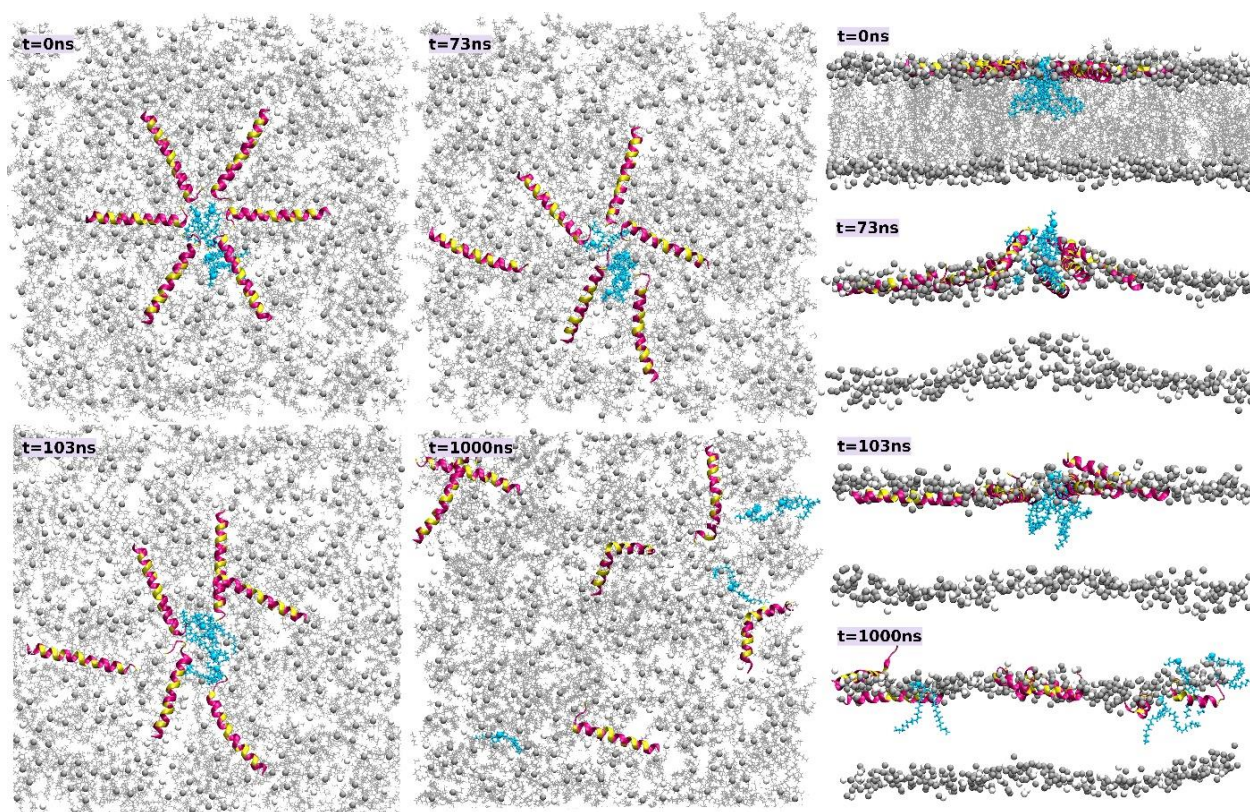
Slika 58 Sekundarna struktura anisaxina-2S tijekom interakcije s POPE:POPG membranom u simulaciji I. Uočava se očuvanost dijela u obliku α -uzvojnice od N terminala do Gly²¹ i fleksibilnost ostatka.



Slika 59 Početno (a) i konačno (b i c, pogled sa strane i odozgo) stanje u simulaciji I (jedan anisaxin-2S u interakciji s POPE:POPG membranom). Peptid (anisaxin-2S) je prikazan u obliku vrpce (žuto - nabijeni ostaci, tirkizno – glicini, magenta - preostale AA). Membrana je predstavljena s atomima P prikazanim kuglicama, a acilni lanci linijama (POPE – siva; POPG – bijela), ostali atomi i molekule vode nisu prikazani radi preglednosti.

3.3.2 Simulacije sa šest peptida, P/L=1/128

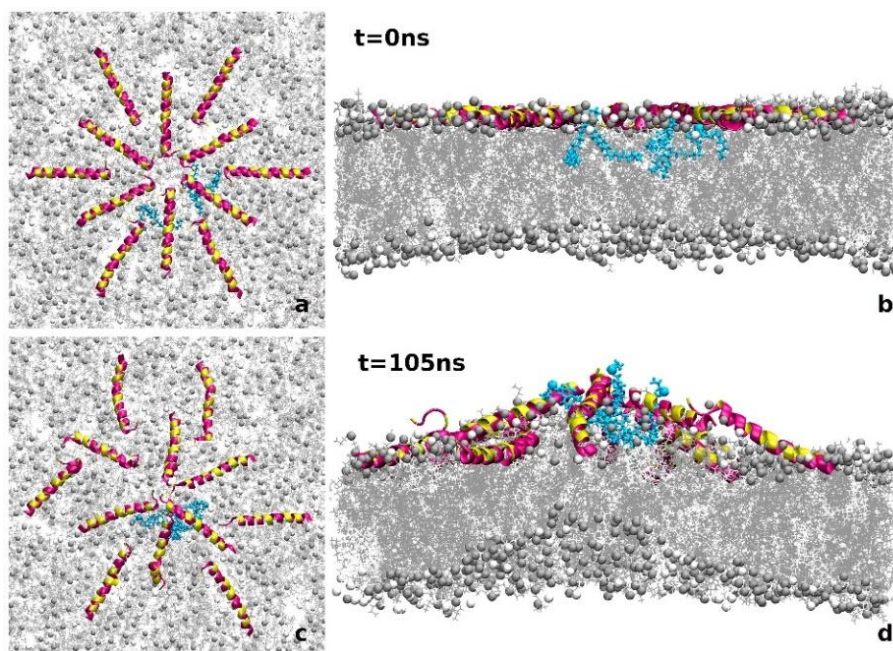
U ovim simulacijama šest anisaxina-2S raspoređenih u oblik zvijezde djelomično su umetnuti u polarni dio gornjeg sloja membrane (simulacija II-a, **sl. 60**) ili postavljeni iznad površine membrane na udaljenosti ~2 nm (simulacija II-b, **sl. 91** u Prilozima) (vidi i **tablicu 4**). Peptidi ne pokazuju tendenciju udruživanja, nego se udaljavaju jedan od drugoga. Udruživanje je uočeno samo u obliku dimera (jedan u sim. II-a, **sl. 60** odnosno dva u sim. II-b, **sl. 91** u Prilozima) koji su ostali u kontaktu do kraja simulacije. U simulaciji II-a, nakon 20 ns, dok su peptidi još bili blizu jedni drugih, uočeno je lokalno mijenjanje morfologije membrane u obliku ispupčenja u oba sloja membrane, u dijelu s najvećom lokalnom gustoćom vezanih peptida. Nakon ~100 ns simulacije, kad su se peptidi razmaknuli, deformacija je postupno nestala (**sl. 60**). U simulaciji II-b, nije uočena znatnija promjena morfologije membrane (**sl. 91** u Prilozima).



Slika 60 Početno (0 ns), dva karakteristična (73 ns i 100 ns) i konačno stanje (1000 ns) u simulaciji II-a (interakcija šest anisaxin-2S peptida inicijalno smještenih u zvjezdastu formaciju umetnutu u polarnu regiju POPE:POPG membrane). Slike prikazuju pogled odozgo i sa strane u naznačenim trenutcima. Peptidi su prikazani u obliku vrpce (žuto - nabijeni ostaci, magenta - preostale AA). Membrana je predstavljena s atomima P prikazanim kuglicama, a acilni lanci linijama (POPE – siva; POPG – bijela). Tirkiznom bojom su označeni lipidi iz gornjeg sloja s najvećom tendencijom izdvajanja prema otopini. Ostali atomi i molekule vode nisu prikazani radi preglednosti.

3.3.3 Simulacije sa 12 peptida, P/L=1/64

U ovim simulacijama broj peptida je udvostručen, a početne konfiguracije su pravilno proširena zvjezdasta formacija (simulacija III-1, **sl. 61**) i nasumično raspoređeni peptidi (simulacija III-2, **sl. 92** u Prilozima), sa peptidima uronjenim u polarnu regiju gornjeg sloja membrane. U oba slučaja pojavljuje se ispupčenje opisano u simulaciji II-a, koje je ovdje još izraženije, i nastupa već nakon prvih nekoliko nanosekundi simulacije. U središnjem dijelu, gdje je gustoća peptida najveća, peptidi se izdižu povlačeći za sobom okolne lipide, što rezultira deformacijom membrane u središnjem dijelu na način da se lipidi iz oba sloja izdižu u odnosu na ravnotežnu ravninu. No sila povlačenja od strane peptida nije dovoljna za potpunu ekstrakciju lipida, te se membrana s vremenom (već nakon ~100 ns) relaksira, a peptidi razmiču smanjujući površinsku napetost membrane. Tijekom simulacija od 1 μ s opisana deformacija se pojavljuje još nekoliko puta ali sve manje izražena.



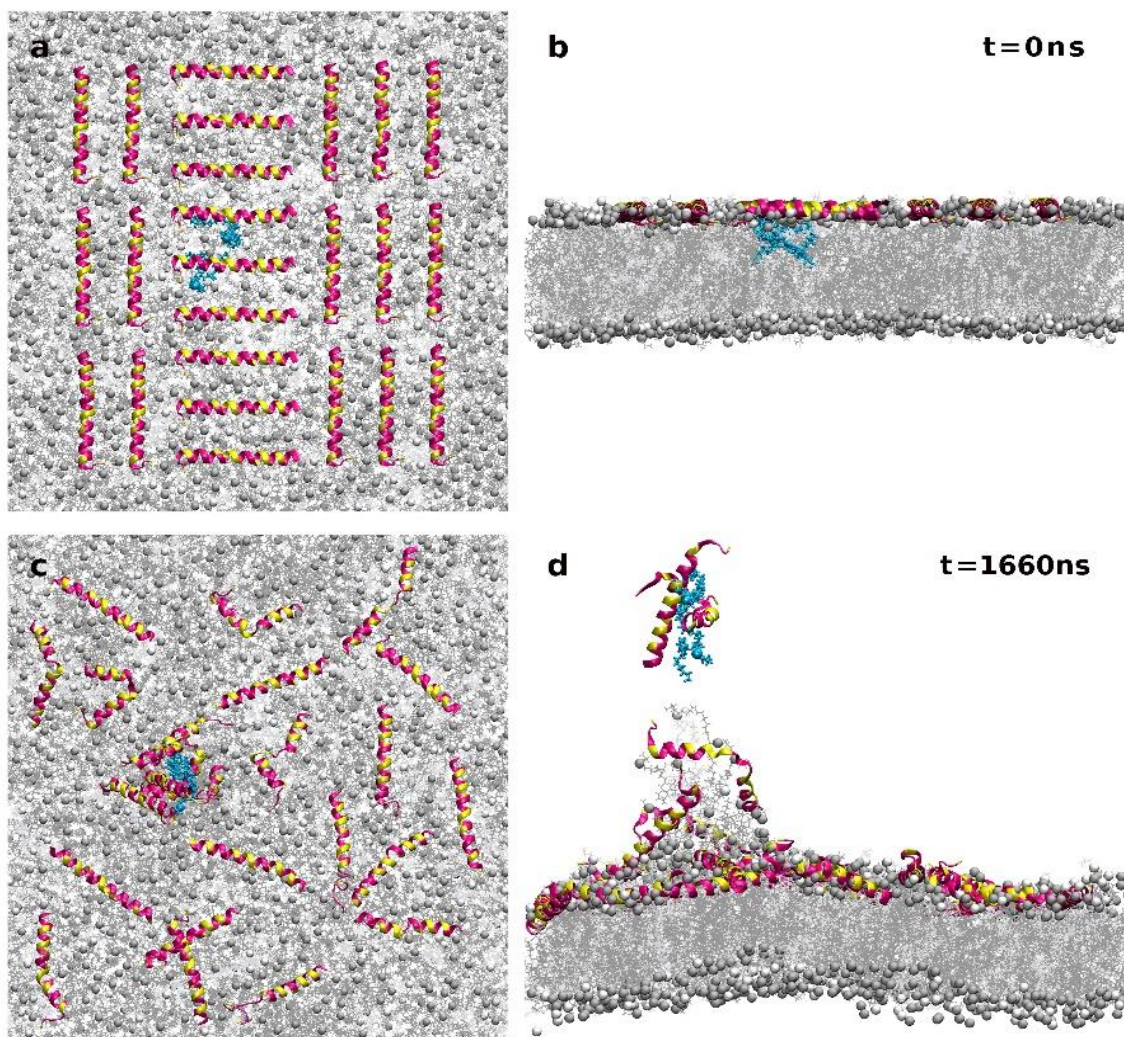
Slika 61 Početno (a, b) i karakteristično (c, d) stanje u simulaciji III-1 (interakcija 12 anisaxin-2S peptida smještenih u dvostruku zvjezdastu formaciju inicijalno umetnutu u polarnu regiju POPE:POPG membrane). Slike prikazuju pogled odozgo i sa strane u naznačenim trenucima. U trenutku 105 ns vidljivo je relativno veliko ispupčenje u oba sloja membrane. Raspored boja je analogan onima na **sl. 60**.

3.3.4 Simulacije sa dvadeset i četiri peptida, P/L=1/32.

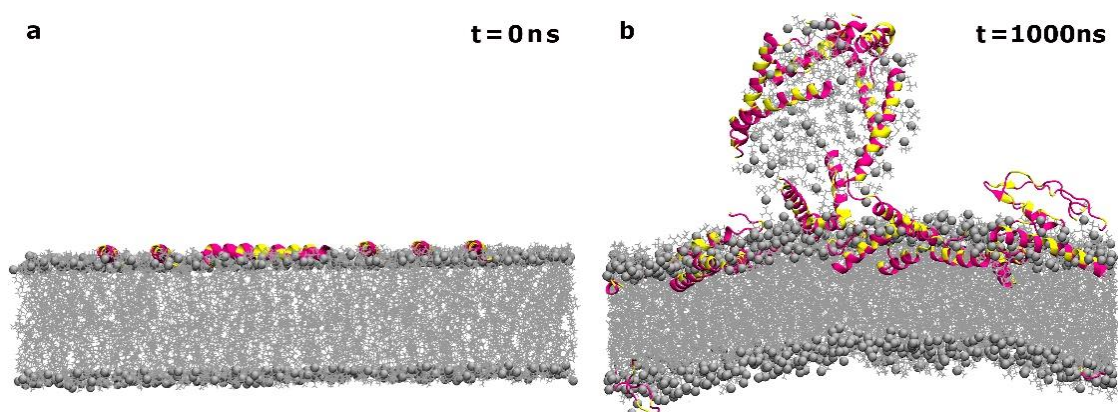
Osim na anionskom POPE:POPG modelu bakterijskih citoplazmatskih membrana, simulacije sa dvadeset i četiri peptida napravljene su i na POPC dvojsloju, modelu membrane eukariotskih stanica. Na početku ovih simulacija peptidi anisaxina-2S su raspoređeni u ravnini paralelnoj s površinom membrane na dva načina: A. djelomično umetnuti u polarno područje gornjeg membranskog sloja (simulacije IV-a i V-a) i B. iznad membrane na udaljenosti ~2 nm (simulacije IV-b i V-b, **tablica 4**).

A. *Peptidi inicijalno djelomično umetnuti u polarno područje membrane.* U slučajevima kad su anisaxini-2S djelomično umetnuti u polarno područje, deformacija membrane u obliku ispupčenja u oba sloja pojavljuje se već nakon nekoliko nanosekundi. Kod POPE:POPG membrane, jako izraženo ispupčenje prisutno je tijekom prvih ~400 ns simulacije, kada se malo smanjilo, da bi se nakon 100 ns počelo ponovo povećavati. Četiri do pet peptida se nakon toga počinju znatnije izdizati iznad membrane (2-3 nm) povlačeći za sobom desetak lipida (obaju vrsta, POPE i POPG) iz gornjeg sloja. Proces je nakon ~1.6 μ s rezultirao potpunom ekstrakcijom dvaju POPE lipida iz gornjeg sloja membrane vezanih na dva izdvojena peptida (**sl. 62**). Izdvojeni kompleks od dva peptida i dva lipida je potom, zbog periodičkih uvjeta postavljenih na simulacijsku kutiju, nakon nekoliko nanosekundi prešao na donju stranu membrane, peptidi su se vezali na donji sloj, a lipidi nakon ~20 ns umetnuli kao njegov sastavni dio. Tijekom ovog procesa ispupčenje je iščezlo, a membrana se relaksirala.

Kod POPC membrane, učinak je drugačiji (pojačan), uključeno je više od 10 peptida i oko 40 lipida. Peptidi se nakon ~200 ns izdižu i do 4 nm iznad membrane, povlačeći za sobom lipide iz gornjeg sloja koji formiraju sferični/globularni produžetak membrane promjera oko 3-4 nm (**sl. 63**). Opisana deformacija ostaje stabilna za cijelo vrijeme simulacije (2.1 μ s), no svi lipidi ostaju vezani uz membranu, za razliku od POPE:POPG slučaja, ovdje nije došlo to potpunog otcjepljenja lipida od membrane.

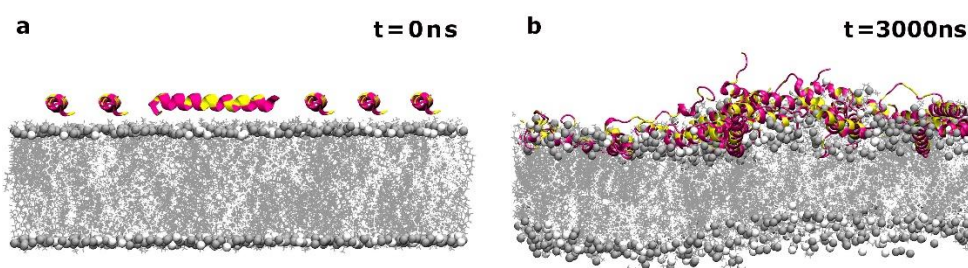


Slika 62 Početno (a, b) i konačno stanje (c, d) u simulaciji V-a (interakcija 24 anisaxin-2S peptida inicijalno umetnuta u polarnu regiju POPE:POPG membrane). Slike prikazuju pogled odozgo i sa strane u naznačenim trenucima. U konačnom stanju prikazana je ekstrakcija dvaju lipida iz gornjeg sloja membrane vezanih na dva izdvojena peptida. Raspored boja je analogan onima na sl. 60.



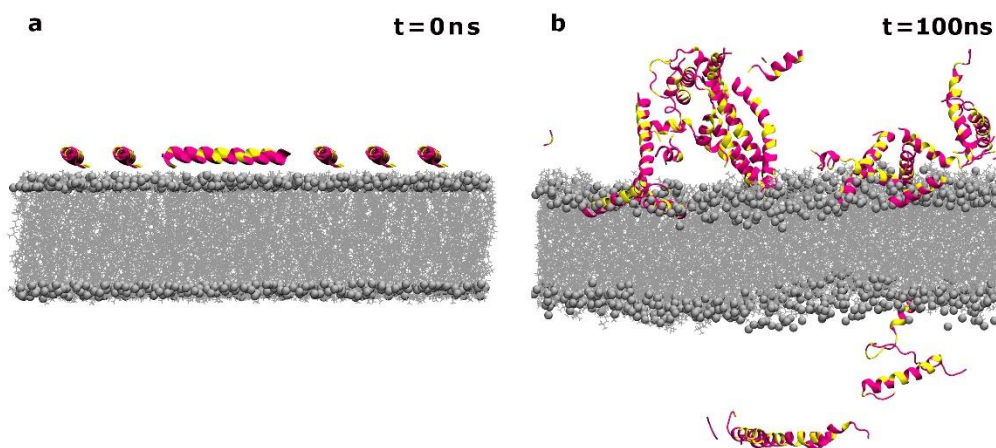
Slika 63 Početno (a) i karakteristično stanje (b) u simulaciji IV-a (interakcija 24 anisaxin-2S peptida inicijalno umetnuta u polarnu regiju POPC membrane). Slika desno prikazuje globularni produžetak membrane promjera 3-4 nm. Peptidi su prikazani u obliku vrpce (žuto - nabijeni ostaci, magenta - preostale AA). Membrana je predstavljena s atomima P prikazanim kuglicama, a acilni lanci linijama. Ostali atomi i molekule vode nisu prikazani radi preglednosti. Raspored boja je analogan onima na sl. 60.

B. *Peptidi inicijalno iznad membrane.* U slučajevima kad su peptidi postavljeni iznad membrane (~2 nm), opisani učinak nije prisutan. Svi peptidi se vrlo brzo vežu za anionsku POPE:POPG membranu na kojoj se tijekom prvih ~100 ns može uočiti manje ispupčenje koje se potom smanjuje s raspoređivanjem peptida po površini membrane, udruženi u grupe od 2-3 peptida ili samostalni. Nakon ~500 ns par manjih grupa peptida se počinje udruživati u veći klaster, a na membrani se uočavaju manja ili veća ispupčenja sa sporadičnim izdvajanjem pojedinih lipida. Opisani poremećaji postaju izraženiji kako je simulacija odmicala, no do kraja simulacije (3 μ s) izostaje njena trajnija lokalna deformacija (sl. 64).



Slika 64 Početno (a) i konačno stanje (b) u simulaciji IV-b (interakcija 24 anisaxin-2S peptida inicijalno postavljena ~2 nm iznad POPE:POPG membrane). Raspored boja je analogan onima na sl. 60.

Za razliku od anionske, peptidi pokazuju vrlo slabu tendenciju vezanja za neutralnu POPC membranu. Tek nekoliko peptida se veže za membranu, a ostali se udružuju oko njih tvoreći strukture od 4-5 peptida okomite na površinu membrane, ili ostaju u otopini (sl. 65)

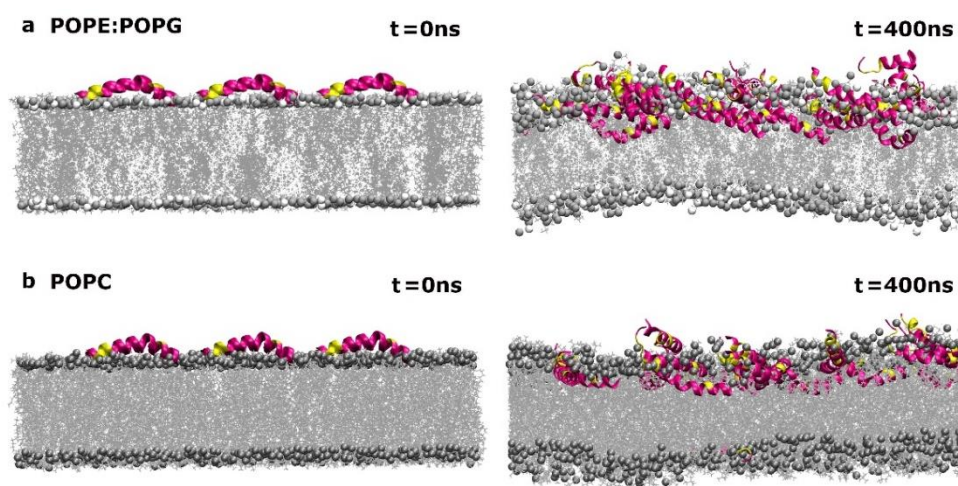


Slika 65 Početno (a) i konačno stanje (b) u simulaciji V-b (interakcija 24 anisaxin-2S peptida inicijalno postavljena ~2 nm iznad POPC membrane). Raspored boja je analogan onima na sl. 60.

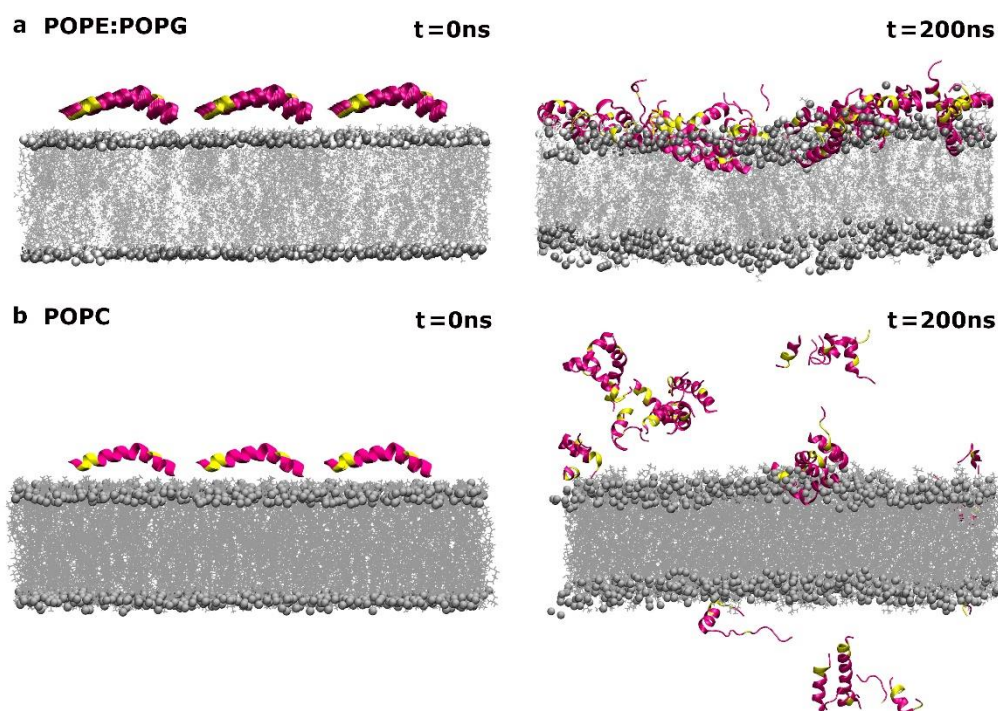
3.3.5 Usporedba s melitinom, P/L=1/32

Eksperimentalno je utvrđeno da anisaxini i melitin imaju sličan način djelovanja na membrane: kreiranje tranzientnih pora bez vidljivih deformacija membrane, koje uzrokuju istjecanje unutarstaničnog materijala te posljedično smrt bakterije [83], [141], [142]. Osim toga, deformacije membrane poput gore opisanih za anisaxin-2S uočene su u nedavnoj krupnozrnatost simulaciji melitina s neutralnom membranom [78]. U navedenoj studiji detektirano je izdizanje peptida uz izvlačenje lipida, ali do kraja simulacije ($\sim 20 \mu\text{s}$) nije došlo do potpunog odvajanja lipida iz gornjeg sloja, kao u simulaciji IV-a anisaxina-2S (**odjeljak 3.3.4 A**). Radi usporedbe, atomističkim simulacijama ispitane su interakcije melitina s obje vrste membrane u P/L omjeru 1/32 (simulacije VI i VII, **tablica 4**). Dvadeset i četiri melitina postavljene su u slične uvjete kao u simulacijama IV i V, djelomično umetnute u polarno područje gornjeg membranskog sloja (simulacije VI-a i VII-a) i iznad membrane na udaljenosti $\sim 2 \text{ nm}$ (simulacije VI-b i VII-b).

Melitini umetnute u POPE:POPG ili POPC membranu izazivaju njena povremena ispupčenja, slično kao u slučaju anisaxina-2S, ali koja za vrijeme simulacija ($0.4 \mu\text{s}$) ne rezultiraju većim efektom na njenu strukturu (**sl. 66**). Izostaje izdizanje i odvajanje peptida odnosno lipida prema otopini. Umjesto toga razmjerno velik broj peptida ulazi dublje, što ukazuje na veću preferenciju melitina za umetanjem u membranu. Simulacije ukazuju na manji afinitet vezanja za neutralnu POPC membranu, no oni koji su vezani pokazuju sličan mehanizam umetanja kao u slučaju POPE:POPG membrane (**sl. 67**).



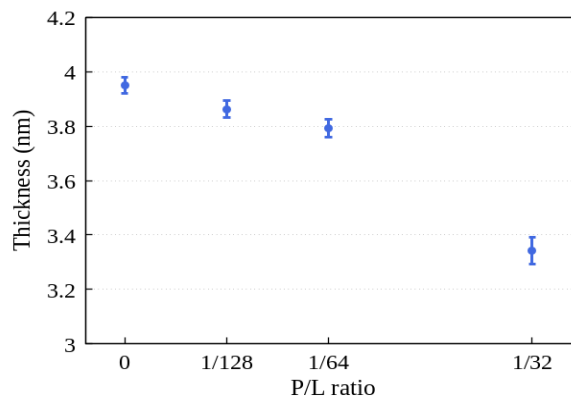
Slika 66 Početno (0 ns) i konačno stanje (400 ns) u simulacijama VI-a (a) i VII-a (b) (interakcija 24 melitina inicijalno umetnuta u gornji sloj POPE:POPG ili POPC membrane). Raspored boja je analogan onima na **sl. 60**.



Slika 67 Početno (0 ns) i konačno stanje (200 ns) u simulacijama VI-b (a) i VII-b (b) (interakcija 24 melitina inicijalno postavljena ~2 nm iznad POPE:POPG ili POPC membrane). Raspored boja je analogan onima na sl. 60.

3.3.6 Diskusija

Opisano modeliranje ukazuje na mogući mehanizam djelovanja anisaxina-2S. Simulacije jednog peptida ukazuju na strukturnu fleksibilnost povezanu sa savijanjem na položaju Gly²¹ ili Gly²⁸, koji razdvajaju peptid na veći dio blizu N kraja u strukturi uzvojnice i manji razmotani dio na C kraju peptida. Ovakva vrsta strukturiranja uz savijanje na Gly¹⁴, pri čemu se peptid dijeli na dvije uzvojnice koje su uglavnom stabilne tijekom simulacije, prisutna je i u slučajevima s većim koncentracijama peptida, bilo da su udruženi ili samostalni. Simulacije s više peptida pokazale su izražene poremećaje u membrani zbog povećanja površinske napetosti membrane izazvanog velikom gustoćom vezanih peptida. Intenzitet poremećaja ovisi o koncentraciji lipida, odnosno o P/L omjeru. Primjerice, opisane simulacije pokazuju da debljina membrane jako ovisi koncentraciji lipida na način da veći P/L omjer uzrokuje stanjivanje anionske membrane, što je prikazano na sl. 68.



Slika 68 Prosječna debljina POPE/POPG membrane kao funkcija omjera peptida i lipida (P/L) u simulacijama I, II-a, III-1 i IV-a. Stanjivanje membrane ovisi o površinskim koncentracijama peptida na način da se smanjuje s povećanjem P/L omjera.

Osim toga uočene su značajne deformacije membrane koje su nekim slučajevima rezultirale potpunom ili djelomičnom ekstrakcijom lipida iz gornjeg sloja (sl. 62 i 63). Prema saznanjima autora, potpuna ekstrakcija lipida uzrokovana djelovanjem AMP-a do sada nije zabilježena u literaturi. Na ovaj način nastaje asimetrija u lokalnoj gustoći lipida u dva membranska sloja, što može smanjiti energetska barijeru za njenu dezintegraciju [49], [78]. Stoga je moguće da litički mehanizam anisaxina-2S počinje dovoljno velikim nakupljanjem peptida na površini membrane koji uzrokuju deformacije membrane koje mogu uključivati i izdvajanje lipida, čime se membrana lokalno destabilizira omogućujući peptidima prodiranje u membranu i daljnju destabilizaciju koja može voditi stvaranje pora. Ovaj mehanizam je vrlo osjetljiv na lokalnu koncentraciju peptida, kao što naši rezultati pokazuju, deformacija membrane je uočena i za manje P/L omjere, ali dodatna površinska napetost tako stvorena nije bila dovoljna da bi se mehanizam djelovanja nastavio.

Rezultati pokazuju kooperativno djelovanje anisaxina-2S pri destabilizaciji membrane. Obzirom da peptidi pokazuju malu tendenciju za udruživanjem, potreban je veliki broj peptida da bi se ostvarila dovoljno velika lokalna koncentracija koja uzrokuje jake lokalne fluktuacije u membrani i povećanje lateralne napetosti u gornjem sloju. Ovo sugerira da je eksperimentalno uočeni efekt oporavka bakterije od kreiranih tranzientnih lezija pri koncentracijama anisaxina-2s manjim od MIC vrijednosti (vidi **odjeljak 2.3.1**), povezan s njenom sposobnošću da spriječi lokalnu akumulaciju peptida.

Opisani efekti dobiveni molekularno dinamičkim simulacijama konzistentni su s eksperimentalno potvrđenom permeabilizacijom membrane u prisutnosti anisaxina-2S [83] i smanjenjem veličine bakterijske stanice, što sugerira da je smrt bakterije uzrokovana curenjem unutarstaničnog materijala nastalog djelovanjem anisaxina. U skladu s tim su i eksperimentalni rezultati prema kojima mehanizam djelovanja anisaxina ne uključuje inhibiciju unutarstaničnih procesa [83].

Simulacije nadalje ukazuju i na postojanje razlike u interakcijama anisaxina-2S i melitina. Anisaxin-2S ostaje na površini membrane i ako je njihova lokalna površinska gustoća dovoljna, povećana lateralna napetost istiskuje peptide prema van pri čemu oni povlače za sobom okolne lipide. Kod anionske membrane takav mehanizam može rezultirati potpunom ekstrakcijom

nekoliko lipida što, ako se događa na više bliskih mjesta, može dovesti do stvaranja lokalnih defakata koji snižavaju energetska barijeru za stvaranje pore odnosno narušavanje integriteta membrane. Kod neutralne membrane taj mehanizam uzrokuje stvaranje globule ali ne rezultira izdvajanjem lipida, odnosno moguće da ne dolazi do pucanja membrane, što je, ako uzmemo u obzir i njihov mali afinitet za tu vrstu membrane, u suglasju s eksperimentima potvrđenom slabom aktivnosti parazitskih anisaxina prema stanicama domaćina. Takvi učinci nisu uočeni u slučajevima simulacija melitina.

Ovi rezultati kvalitativno opisuju dio mehanizma djelovanja anisaxina-2S. Potpunije razumijevanje uslijedit će nakon analize i fizikalnog modela ekstrakcije koji još uvijek nemamo.

Zaključno, simulacije molekulske dinamike ukazuju na pretpostavljeni mehanizam djelovanja anisaxina. Simulacije jednog peptida otkrile su vezu strukturne fleksibilnosti sa savijanjem na mjestima na kojima se nalaze glicini u blizini C kraja peptida, čime se peptid razdvaja na dva dijela, veći dio blizu N kraja sa stabilnom strukturom uzvojnice i manji dio blizu C kraja sa varijabilnom strukturom. Ova vrsta strukturiranja događa se i u ostalim simulacijskim slučajevima s dodatkom savijanja na centralnom glicinu (Gly¹⁴) što često rezultira podjelom peptida na dvije stabilne uzvojnice s kutom od 100°-120° između njih. Simulacije sa više peptida pokazale su poremećaje u membranama zbog dodatne površinske napetosti izazvane peptidima. Učinak uvelike ovisi o P/L omjeru, što je poznato iz literature [65].

Slično opaženom ponašanju u studijama interakcije melitina s membranama [78], ova vrsta deformacije membrane koja uključuje ispupčenja u lipidnim slojevima i ekstrakciju lipida iz gornjeg sloja, može biti prvi korak koji dovodi do umetanja peptida i stvaranja pora. Međutim, nekoliko stvari treba imati na umu kada se radi ova usporedba. Navedena studija interakcija melitina napravljena je s krupnozrnatom (CG) modelom koji omogućuje velika vremena simulacije, ali i bržu evoluciju sustava, budući da su odgovarajućem polju sile interakcije manje snažne, u odnosu na atomističke modele. Važnija je razlika u peptidima, melitin je manji (26 aminokiselina), ima simetričnu strukturu u obliku slova V, i osim oblika uzvojnice, ne pokazuje strukturnu sličnost s anisaxinom. Međutim, eksperimentalni rezultati su slični (vidi **odjeljak 2.3.1**) što bi mogao biti pokazatelj sličnosti u načinu njihova djelovanja. Simulacije ukazuju na veliku razliku u koracima koji prate opaženu deformaciju membrane, posebno u mikroskopskim detaljima procesa umetanja, koji dovode do sličnog učinka, stvaranja nestabilne, prolazne pore.

Ovdje treba naglasiti poteškoće koje se javljaju pri ovakvim usporedbama molekularno dinamičkim simulacijama. Naime, već je naglašeno da sadašnji računalni resursi nisu dovoljni da bi se atomističkim simulacijama mogao promatrati cijeli proces, od približavanja peptida membrani do konačnog kreiranja pore odnosno dezintegracije membrane, te da se uobičajeno promatraju samo pojedini dijelovi tog procesa. U ovom radu peptidi su inicijalno u blizini membrane ili vezani na njenu površinu. U slučaju kad su vezani na površinu membrane, vrlo je teško postići identične početne uvjete, obzirom na razlike u veličini i konformaciji anisaxina i melitina. Detaljna analiza i usporedba molekularno dinamičkim simulacijama treba uzeti u obzir

ove razlike, a početne uvjete treba kontrolirati mjerenjem odgovarajućih površina koje zauzimaju peptidi i lipidi (APL) u gornjem i donjem sloju, te drugih čimbenika koji mogu utjecati na rezultat.

4 ZAKLJUČAK

Antimikrobni peptidi su mali, uglavnom kationski peptidi koji sadrže do 100 aminokiselina, od kojih veliku obitelj čine linearni peptidi u obliku α -uzvojnice. Imaju raznovrsnu anti-infektivnu ulogu, pokazujući višestruko baktericidno, antivirusno, antikancerogeno i antifungalno djelovanje, te sposobnost poticanja imunološkog sustava domaćina. Većina njihove antibakterijske aktivnosti povezana je s izravnim djelovanjem na negativno nabijene bakterijske membrane, destabilizirajući ih stvaranjem pora ili drugih vrsta lezija, no njihova aktivnost može uključivati i inhibiciju unutarstaničnih procesa. Obzirom da AMP-ovi uglavnom djeluju izravno na membranu, bakterije teško mogu razviti otpornost na njih, što ih čini obećavajućim izvorima novih lijekova [4].

Precizni mehanizmi djelovanja AMP-a mogu biti vrlo raznoliki i složeni. Utvrđeno je da neka svojstva AMP-a pogoduju njihovoj aktivnosti, kao što je ukupan pozitivni naboj koji pospješuje vezanje na negativnu površinu bakterijske membrane, amfipatičnost koja olakšava umetanje u hidrofobni sloj membrane te strukturna fleksibilnost koja omogućuje brzu konformacijsku prilagodbu različitim okruženjima. Nadalje, interakcije AMP-ova s dijelovima membrana specifičnog lipidnog sastava, međusobno udruživanje peptida prije kontakta s membranom ili na površini membrane, te povezanost s drugim spojevima ili površinama također imaju važne uloge u njihovom načinu djelovanja [18].

Da bi se AMP-ovi mogli koristiti kao anti-infektivna sredstva, njihova strukturna svojstva trebaju biti fino podešena da bi se pojačalo baktericidno djelovanje uz istovremeno smanjenje toksičnosti protiv stanica domaćina. Potrebne su mnoge studije slučaja da bi se izvuklo dovoljno informacija i izgradila dovoljno općenita, ali detaljna slika njihovih bitnih karakteristika, kako bi se omogućila njihova uspješna klinička uporaba koja bi doprinijela rješavanju problema sve veće otpornosti bakterija na antibiotike. Prostorno-vremenska karakteristika procesa interakcije AMP-a sa mikrobima doprinosi da su *in vivo* i *in vitro* eksperimenti zahtjevni pa se kao njima komplementaran alat koriste simulacije molekulske dinamike, kojima se može dobiti uvid u precizne detalje njihova mehanizma djelovanja [36].

U ovom radu, simulacijskim metodama molekulske dinamike (MD) ispitano je međudjelovanje i karakteristike sustava koji sadrže tri vrste antimikrobnih peptida 1) adeptantin-1, 2) kiadine i 3) anisaxin-2S, otopljene u vodi u neposrednoj blizini različitih vrsta membrana. Izvedene su atomističke (AA), združeno-atomske (UA) i krupnozrnate (CG) simulacije.

1) Adeptantin-1 je sintetski peptid kreiran *Designer* računalnim programom. Ima strukturu uzvojnice i izrazito visoku selektivnost prema Gram-negativnim bakterijama, nešto manju prema Gram-pozitivnim, i vrlo malu toksičnost prema ljudskim stanicama, zbog čega ima izrazito veliki SI indeks [11].

Simulacije pokazuju da se adeptantin-1 snažno veže na Gram-negativne i na Gram-pozitivne bakterijske citoplazmatske membrane, a jako slabo na modele membrana eukariotskih stanica (sl.

15, što je u skladu s eksperimentalno utvrđenom antimikrobnom aktivnosti. U simulacijama s Gram-negativnim i Gram-pozitivnim modelima uočene su male razlike u strukturi i dinamici peptida (**odjeljak 3.1.1**), koje nisu dovoljne da bi se objasnila veća, eksperimentalno potvrđena, antibakterijska aktivnost prema *E. coli* u usporedbi sa aktivnosti prema *S. aureus*. Može se stoga pretpostaviti da različiti vanjski slojevi bakterijskih membrana igraju važnu ulogu u selektivnosti adeptantina-1 za Gram-negativne bakterije. Simulacijama je nadalje istraženo početno vezanje adeptantina-1 na vanjsku membranu Gram-negativnih bakterija. Uočeni su različiti afiniteti vezanja peptida za pojedine dijelove lipopolisahardinog sloja: snažno vezanje za O-antigenski sloj i slabo vezanje za područje jezgre koje može biti uzrokovano utjecajem divalentnih kationa iz tog sloja koji nekovalentno povezuju molekule LPS-a (**odjeljak 3.1.4**). Također može se pretpostaviti da jako vezanje za O-antigenski sloj omogućuje peptidima pogodno okruženje za istiskivanje kationa te daljnje prodiranje kroz jezgri sloj u slučaju glatkih membrana. Dulja simulacijska vremena i naprednije simulacijske metode su potrebne da bi se ispitaio mehanizam prolaska peptida kroz slojeve vanjske membrane.

Simulacije pokazuju da Adeptantin-1, bilo kao pojedinačni, dimerni ili u obliku klastera s više peptida, stupa u interakciju s bakterijskom membranom na način da se najprije elektrostatski veže na njenu polarnu površinu nakon čega slijedi umetanje hidrofobnih dijelova u hidrofobnu unutrašnjost membrane (**sl. 15 i 17**). Simulacije su nadalje potvrdile visok afinitet adeptantina-1 za udruživanje, koje se pokazalo kao važna komponenta njegove aktivnosti. Klasteri nastaju prvenstveno zbog hidrofobnih interakcija, što se očituje u njihovoj hidrofobnoj jezgri i polarnoj površini, bilo u otopini ili istodobno s vezanjem peptida na površinu membrane. Udruženi peptidi čuvaju amfipatsku strukturu α -uzvojnice, što ukazuje da agregati mogu djelovati kao promotori strukturiranja peptida u konformaciju povoljnu za umetanje. U polarnom okruženju, u vodi ili na površini membrane, agregati su stabilni, sa hidrofobnom unutrašnjosti i polarnom površinom. Međutim, kad se klaster uvlači dublje u membranu hidrofobni ostaci postaju izloženi njenoj hidrofobnoj unutrašnjosti, pri čemu se njegova stabilnost smanjuje. To dovodi do odvajanja pojedinih peptida od agregata koji difundiraju kroz polarnu regiju membrane, pojedinačno ili udruženi u antiparalelni dimer.

Translokacija peptida ili dezintegracija membrane nisu primijećeni niti u atomističkim niti u simulacijama krupnog zrna, stoga možemo pretpostaviti da su, uz dulje simulacijsko vrijeme, potrebne veće koncentracije peptida koje bi uzrokovale veće poremećaje membrane koji bi doveli do njenog probijanja. Valja napomenuti kako se uz ograničene računalne resurse javljaju poteškoće pri povećanju koncentracije peptida, odnosno P/L omjera. Naime, povećanjem broja peptida povećavaju se i njihove fluktuacije prije udruživanja i vezanja za membranu, usljed čega neki peptidi prelaze u periodičku sliku simulacijske kutije, što posljedično dovodi do njihova vezanja za donji sloj membrane, što simulaciju čini nevaljanom.

2) Šest kiadina zajedno sa *diPGLa-H* čine familiju linearnih antimikrobnih peptida iste veličine i naboja, više od 50% identičnih, ali s različitim brojem i položajem ostataka glicina u njihovoj primarnoj sekvenci. Kao takvi čine konzistentan skup AMP-ova u obliku α -uzvojnice za istraživanje učinka Gly supstitucija na njihove strukturne karakteristike i mehanizam djelovanja prema membranama.

Antibakterijski testovi su pokazali [54] da supstitucije jednog ili više glicina u sekvencama kiadina rezultiraju značajnim varijacijama u antimikrobnoj aktivnosti i bakterijskom spektru, pri čemu na antimikrobnu aktivnost više utjece mjesto nego broj zamjena. Jedna supstitucija glicina u kiadinu-1 pomaže antimikrobnoj potentnosti bez značajnog utjecaja na selektivnost ili citotoksičnost, dok supstitucija glicina na različitom položaju u kiadinu-2 poboljšava aktivnost protiv Gram-negativne bakterije i smanjuje citotoksičnost, ali nauštrb smanjene aktivnosti protiv Gram-pozitivnih bakterija. Za kiadin-6, pojedinačna Gly supstitucija ne samo da smanjuje ukupnu antimikrobnu moć, već također značajno povećava citotoksičnost, što je još izraženije kod četverosturko supstituiranog kiadina-4 (**tablica 3**).

MD simulacije pokazuju da svi kiadini brzo stupaju u interakciju s anionskom i neutralnom membranom (**sl. 47**), mijenjanjući pri tom svoje konformacije kako bi povećali hidrofobne momente na način koji pospješuje umetanje u lipidni dvosloj (**odjeljak 3.2.3**). Supstitucije glicina različito utječu na očuvanje strukture uzvojnice, što ovisi o njihovom položaju i vrsti membrane s kojom stupaju u interakciju (neutralna ili anionska), ali nije nužno u korelaciji s brojem Gly zamjena, za koje bi se očekivalo da povećavaju njenu fleksibilnost. Naime kiadini -2, -3 i -6, s jednim ili dva Gly ostatka na različitim položajima, zapravo su pokazali sveukupno stabilnije strukture od roditeljskog peptida *diPGLa-H*, koji ne sadrži Gly ostatke. Čak i četiri zamjene glicinskih ostataka ne moraju nužno smanjiti konformacijsku stabilnost, kao što se može vidjeti kod kiadina-4 (**sl. 50**).

Svi kiadini pokazuju strukturiranje u prisutnosti anionskih LUV-ova, što je eksperimentalno pokazano CD spektrima (**sl. 57**), sugerirajući da se u kasnijim fazama umeću u bakterijske dvosloje u dobro definiranoj konformaciji. Međutim, za većinu peptida (osim kiadina-5), čini se da ova konformacija značajno odstupa od kanonske α -uzvojnice, moguće zbog njihova udruživanja u klastere, što bi moglo biti važno za njihov mehanizam antimikrobnog djelovanja. U prisutnosti neutralnih vezikula CD spektri ukazuju da s iznimkom kiadina-6 svi peptidi imaju mali udio strukture uzvojnice (kiadin-5 najmanje), što bi sugeriralo da ne stupaju u snažnu interakciju s ovom vrstom membrane. No eksperimenti pokazuju da su neki prilično citotoksični za cirkulirajuće krvne stanice (**tablica 3**). CD signal može uključivati doprinose iz različitih populacija peptida, onih u otopini ili vezanih za membranu, i moguće je da citotoksično ponašanje proizlazi iz relativno niskog udjela peptida koji se umeću u neutralne membrane (prema CD spektrima procjenjuje se na < 10% za većinu kiadina). Stoga treba biti oprezan pri korištenju CD spektra u prisutnosti neutralnih LUV-ova za predviđanje citotoksičnosti AMP-a ili izostanka iste. Prikladno je stoga nadopuniti ih mjerenjima kao što je SPR, koja ispituju samo populaciju peptida vezanu na membranu, i koja mogu razlikovati različite vrste vezanja. SPR podaci pružaju informacije o

vezanju na membranu koje su u puno kasnijoj fazi od MD simulacija i prilično su osjetljive na procese agregacije na površini membrane. Rezultati SPR-a (sl. 90 u Prilozima i **odjeljak 3.2.5**) sugeriraju da se neki peptidi udružuju u membrani, dok se drugi akumuliraju bez agregacije, ali uzrokuju poremećaj membrane. SPR studije pokazuju da kiadin-5 ima najmanji kapacitet vezanja/umetanja, a kiadin-6 najveći, što je u skladu s njihovim CD spektrima (sl. 57) i također je u korelaciji s time da su najmanje odnosno najviše citotoksični za stanice domaćina (**tablica 3**).

Otkrivanje mehanizma djelovanja kiadina na temelju korelacije eksperimentalnih podataka s rezultatima molekularnog modeliranja pokazalo se prilično teškim. Ova studija stoga daje neke odgovore o tome kako supstitucije glicina utječu na interakciju linearnih AMP-ova koji imaju strukturu uzvojnice s biološkim membranama i kako to pridonosi njihovom načinu djelovanja i biološkim aktivnostima. No također otvara i nova pitanja o procesu koji je naizgled mnogo složeniji nego što se u početku pretpostavljalo. Kombinirana uporaba *in silico*, biofizičkih i *in vitro* metoda je ključ uspješnog opisa mehanizma djelovanja a onda i dizajna novih antiinfektivnih sredstava temeljenih na antimikrobnim peptidima.

3) Anisaxin-2S najpotentniji je iz skupine od pet *anisaxina*, AMP-ova identificiranih iz morskih parazita iz roda *Anisakis*. Ima strukturu α -uzvojnice i pokazuje jako dobru aktivnost prema Gram-negativnim bakterijama te nešto manju prema Gram-pozitivnim, uključujući i sojeve koji su razvili otpornost na klasične antibiotike, a ima vrlo malu toksičnost prema ljudskim stanicama.

Testovima⁶ je potvrđeno da se antimikrobni mehanizam sastoji isključivo od direktnog djelovanja na membranu, u kojoj peptidi stvaraju tranzientne pore kroz koje curi unutarstanični materijal, što dovodi do smanjenja veličine, odnosno smrti bakterijske stanice [83]. Utvrđeno je također da mehanizam djelovanja *anisaxina* ne uključuje inhibiciju unutarstaničnih procesa.

Simulacije su potvrdile jak afinitet vezanja peptida za anionske membrane i vrlo mali afinitet za neutralne membrane (**odjeljak 3.3.4 B**) što je u suglasju s eksperimentalno uočenom jakom aktivnosti prema bakterijama i slabom aktivnosti prema stanicama domaćina [83]. Nadalje simulacije su pokazale da *anisaxini* izazivaju poremećaje u membrani (ispupčenja, stanjivanje, ekstrakcija lipida) koji su izraženiji što je koncentracija peptida, odnosno P/L omjer veći. U simulacijama u kojima su na početku peptidi vezani za površinu membrane, kod najvećeg P/L omjera (1/32) u slučaju anionske membrane dolazi do značajnih deformacija membrane koje rezultiraju potpunom ekstrakcijom nekoliko lipida iz gornjeg sloja. Prema saznanjima autora, potpuna ekstrakcija lipida uzrokovana djelovanjem AMP-a do sada nije zabilježena u literaturi. Moguće je da je ovakva ekstrakcija lipida prvi korak u mehanizmu djelovanja, jer tako stvorena asimetrija u lokalnoj gustoći lipida u dva membranska sloja može smanjiti energetska barijeru za prodiranje peptida i stvaranje pore. U istim uvjetima, u slučaju neutralne membrane, uočeno je stvaranje stabilne globule na površini ali bez potpune ekstrakcije lipida, što sugerira da vjerojatno

⁶ Mikroskopijom atomskih sila, protočnom citometrijom, fluorescentnim oslikavanjem i nuklearnom magnetskom rezonancijom čvrstog stanja

ne dolazi do njenog probijanja, što je u skladu sa slabom aktivnosti anisaxina prema eukariotskim stanicama.

Flourescentnim oslikavanjem i protočnom citometrijom je utvrđeno da anisaxini imaju sličan način djelovanja na membrane kao i melitin: kreiranje tranzientnih pora bez vidljivih deformacija membrane [83] [141]. Obzirom da su u nedavnim krupnozrnatim simulacijama melitina s neutralnom membranom uočeni poremećaji slični opisanima [78], radi usporebe napravljene su atomističke simulacije melitina u P/L omjeru 1/32 s obje vrste membrana. U sličnim uvjetima melitini izazivaju povremena ispupčenja membrana, ali izostaje izdizanje peptida odnosno lipida prema otopini. Umjesto toga razmjerno velik broj peptida ulazi dublje, što ukazuje na veću preferenciju melitina za umetanjem u membranu. Simulacije ukazuju na manji afinitet vezanja za neutralnu membranu, no oni koji su vezani pokazuju sličan mehanizam umetanja kao u slučaju anionske membrane.

Treba naglasiti poteškoće koje se javljaju pri usporedbama različitih peptida MD simulacijama. U simulacijama u kojima su peptidi inicijalno vezani za membranu vrlo je teško postići identične početne uvjete (primjerice površine koju zauzimaju peptidi odnosno lipidi iz gornjeg sloja), zbog razlike u veličini i konformaciji anisaxina i melitina, Detaljna analiza i usporedba molekularno dinamičkim simulacijama treba uzeti u obzir ove razlike, a početne uvjete treba kontrolirati mjerenjem odgovarajućih površina i drugih čimbenika koji mogu utjecati na rezultat.

5 EXTENDED SUMMARY

Antimicrobial peptides are small, mostly cationic peptides containing up to 100 amino acids, of which a large family consists of linear peptides in the form of α -helix. They have a diverse anti-infective role, showing multiple bactericidal, antiviral, anticancer and antifungal effects, as well as the ability to stimulate the host's immune system. Most of their antibacterial activity is related to direct action on negatively charged bacterial membranes, destabilizing them by creating pores or other types of lesions, but their activity may also include inhibition of intracellular processes. Since AMPs act directly on the membrane, bacteria can hardly develop resistance to them, which makes them a promising source of new drugs.

The precise mechanisms of action of AMPs can be very diverse and complex. It has been found that some properties of AMPs contribute to their activity, such as the overall positive charge that promotes binding to the negative surface of the bacterial membrane, amphiphaticity that facilitates insertion into the hydrophobic layer of the membrane, and structural flexibility that enables rapid conformational adaptation to different environments. Furthermore, AMPs interactions with parts of membranes of specific lipid composition, the association of peptides with each other before contact with the membrane or on the surface of the membrane, and association with other compounds or surfaces also play important roles in their mode of action.

In order for AMPs to be used as anti-infective agents, their structural properties should be fine-tuned to enhance bactericidal activity while simultaneously reducing toxicity against host cells. Many case studies are needed to extract enough information and build a sufficiently general but detailed picture of their essential characteristics, to enable their successful clinical use that would contribute to solving the problem of increasing bacterial resistance to antibiotics. The space-time characteristic of the process of AMP interaction with microbes contributes to the fact that in vivo and in vitro experiments are demanding, so molecular dynamics (MD) simulations are used as a complementary tool to gain insight into the precise details of their mechanism of action.

In this study, molecular dynamics (MD) simulation methods were used to investigate the interaction and characteristics of systems containing three types of antimicrobial peptides 1) adeptantin-1, 2) kiadins and 3) anisaxin-2S, dissolved in water in the immediate vicinity of different types of membranes. Atomistic (AA), united-atom (UA) and coarse-grained (CG) simulations were performed.

1) Adeptantin-1 is a synthetic peptide created by the *Designer* computer program. It has a helical structure and extremely high selectivity towards Gram-negative bacteria, slightly less towards Gram-positive, and very low toxicity towards human cells, which is why it has an extremely high selectivity index (SI).

Simulations show that adeptantin-1 binds strongly to Gram-negative and Gram-positive bacterial cytoplasmic membranes, and very weakly to eukaryotic cell membrane models, which is consistent

with experimentally determined antimicrobial activity. In the simulations with Gram-negative and Gram-positive models, small differences in the structure and dynamics of the peptide were observed, which are not sufficient to explain the higher, experimentally confirmed, antibacterial activity against *E. coli* compared to the activity against *S. aureus*. It can therefore be assumed that different outer layers of bacterial membranes play an important role in the selectivity of adelpantins-1 for Gram-negative bacteria. Simulations further investigated the initial binding of adelpantins-1 to the outer membrane of Gram-negative bacteria. Different peptide binding affinities for individual parts of the lipopolysaccharide (LPS) layer were observed: strong binding to the O-antigen layer and weak binding to the core region of LPS, which may be caused by the influence of divalent cations from that layer that non-covalently link LPS molecules. It can also be assumed that strong binding to the O-antigen layer provides peptides with a suitable environment for displacing cations and further penetration through the core layer in the case of smooth membranes. Longer simulation times and more advanced simulation methods are needed to investigate the mechanism of peptide passage through the outer membrane layers.

Simulations show that Adelpantins-1, either as a single, dimeric or multi-peptide cluster, interacts with the bacterial membrane by initially electrostatically binding to its polar surface followed by insertion of hydrophobic parts into the hydrophobic interior of the membrane. Simulations further confirmed the high affinity of adelpantins-1 for association, which is shown to be an important component of its activity. Clusters are formed primarily due to hydrophobic interactions, which is manifested in their hydrophobic core and polar surface, either in solution or simultaneously with peptide binding to the membrane surface. The aggregated peptides preserve the amphipathic α -helix structure, indicating that the aggregates may act as promoters of structuring the peptide into a conformation favorable for insertion. In a polar environment, in water or on the membrane surface, the aggregates are stable, with a hydrophobic interior and a polar surface. However, when the cluster is drawn deeper into the membrane, the hydrophobic residues become exposed to its hydrophobic interior, whereby its stability decreases. This leads to the separation of individual peptides from aggregates that diffuse through the polar region of the membrane, individually or united in an antiparallel dimer.

Peptide translocation or membrane disintegration were not observed either in atomistic or coarse-grained simulations, therefore we can assume that longer simulation times and higher concentrations of peptides are required to cause greater perturbations of the membrane that would lead to its breakthrough. It should be noted that with limited computer resources, difficulties arise when increasing the peptide concentration, that is, the P/L ratio. Namely, by increasing the number of peptides, their fluctuations before joining and binding to the membrane increase, as a result of which some peptides move into the periodic image of the simulation box, which consequently leads to their binding to the lower layer of the membrane, which makes the simulation invalid.

2) Six kiadins together with diPGLa-H constitute a family of linear antimicrobial peptides of the same size and charge, more than 50% identical, but with different number and position of glycine residues in their primary sequence. As such, they form a consistent set of α -helical AMPs for exploring the effect of Gly substitutions on their structural characteristics and mechanism of action toward membranes.

Antibacterial tests have shown that substitutions of one or more glycine residues in the kiadin sequences result in significant variations in antimicrobial activity and bacterial spectrum, with antimicrobial activity being more affected by the location than the number of substitutions. A single glycine substitution in kiadin-1 enhances antimicrobial potency without significantly affecting selectivity or cytotoxicity, while a glycine substitution at a different position in kiadin-2 improves activity against Gram-negative bacteria and reduces cytotoxicity, but at the expense of reduced activity against Gram-positive bacteria. For kiadin-6, a single Gly substitution not only reduces the overall antimicrobial potency, but also significantly increases cytotoxicity, which is even more pronounced in quadruple-substituted kiadin-4.

MD simulations show that all kiadins rapidly interact with anionic and neutral membranes, changing their conformations to increase hydrophobic moments in way that facilitates insertion into the lipid bilayer. Glycine substitutions have a different effect on maintaining the helix structure, which depends on their position and the type of membrane they interact with (neutral or anionic), but are not necessarily correlated with the number of Gly substitutions, which would be expected to increase its flexibility. Indeed, kiadins -2, -3 and -6, with one or two Gly residues at different positions, actually showed overall more stable structures than the parent peptide diPGLa-H, which does not contain Gly residues. Even four substitutions of glycine residues do not necessarily reduce conformational stability, as can be seen in kiadin-4.

All kiadins show structuring in the presence of anionic LUVs, as demonstrated experimentally by circular dichroism (CD) spectra, suggesting that they insert into the bacterial bilayers in a well-defined conformation at later stages. However, for most peptides (except kiadin-5), this conformation appears to deviate significantly from the canonical α -helix, possibly due to their clustering, which could be important for their mechanism of antimicrobial action. In the presence of neutral vesicles, CD spectra indicate that with the exception of kiadin-6, all peptides have a low proportion of helical structure (kiadin-5 the least), suggesting that they do not interact strongly with this type of membrane. However, experiments show that some are quite cytotoxic to circulating blood cells. The CD signal may include contributions from different populations of peptides, those in solution or bound to the membrane, and it is possible that the cytotoxic behavior results from the relatively low proportion of peptides that insert into neutral membranes (estimated to be $< 10\%$ for most kiadins by CD spectra). Therefore, caution should be exercised when using CD spectra in the presence of neutral LUVs to predict AMP cytotoxicity or lack thereof. It is therefore appropriate to complement them with measurements such as surface plasmon resonance (SPR), which examine only the membrane-bound peptide population, and which can distinguish between different binding types. SPR data provide information on membrane binding that is at a

much later stage than MD simulations and is quite sensitive to aggregation processes on the membrane surface. The SPR results suggest that some peptides aggregate in the membrane, while others accumulate without aggregation but cause membrane disruption. SPR studies show that kiadin-5 has the lowest binding/insertion capacity and kiadin-6 the highest, which is consistent with their CD spectra and also correlates with being the least and most cytotoxic to host cells, respectively.

Uncovering the mechanism of action of kiadin based on the correlation of experimental data with the results of molecular modeling proved to be quite difficult. This study therefore provides some answers on how glycine substitutions affect the interaction of linear AMPs that have a coiled-coil structure with biological membranes and how this contributes to their mode of action and biological activities. But it also opens up new questions about a process that is apparently much more complex than initially assumed. The combined use of *in silico*, biophysical and *in vitro* methods is the key to a successful description of the mechanism of action and then to the design of new anti-infective agents based on antimicrobial peptides.

3) Anisaxin-2S is the most potent among the group of five anisaxins, AMPs identified from marine parasites of the genus *Anisakis*. It has an α -helix structure and shows very good activity against Gram-negative bacteria and somewhat less against Gram-positive ones, including strains that have developed resistance to classical antibiotics, and has very little toxicity towards human cells.

The tests confirmed that the antimicrobial mechanism consists exclusively of direct action on the membrane, in which the peptides create transient pores through which the intracellular material leaks, leading to a reduction in size, and consequently the death of the bacterial cell. It has also been found that the mechanism of action of anisaxin does not involve the inhibition of intracellular processes.

Simulations have confirmed a strong peptide binding affinity for anionic membranes and a very low affinity for neutral membranes, consistent with the experimentally observed strong activity towards bacteria and weak activity towards host cells. Furthermore, the simulations showed that anisaxins cause disturbances in the membrane (bulging, thinning, lipid extraction), which are more pronounced at higher peptide concentrations, that is, the higher the P/L ratios. In simulations where peptides are initially bound to the membrane surface, at the highest P/L ratio (1/32) in the case of an anionic membrane, significant deformations of the membrane occur, resulting in the complete extraction of several lipids from the upper layer. According to the authors' knowledge, the complete extraction of lipids caused by the action of AMPs has not been reported in the literature to date. It is possible that such lipid extraction is the first step in the mechanism of action, because the resulting asymmetry in the local density of lipids in the two membrane layers can reduce the energy barrier for peptide penetration and pore formation. Under the same conditions, in the case of a neutral membrane, the formation of a stable globule on the surface was observed, but without complete lipid extraction, which suggests that it probably does not break through, which is in line with the weak activity of anisaxins towards eukaryotic cells.

Experimental studies have shown that anisaxins and melittin have a similar mode of action on membranes: creation of transient pores without visible deformations of the membrane. Considering that disturbances similar to those described were observed in recent coarse-grained simulations of melittin with a neutral membrane, atomistic simulations of melittin in a P/L ratio of 1/32 with both types of membranes were made for comparison. Under similar conditions, melittins cause occasional bulging of membranes, but there is no rise of peptides or lipids towards the solution. Instead, a relatively large number of peptides penetrate deeper, indicating a greater preference for melittin to insert into the membrane. Simulations indicate a lower binding affinity for the neutral membrane, but those that are bound show a similar insertion mechanism as in the case of the anionic membrane.

It should be noted that difficulties arise when comparing different peptides by MD simulations. In simulations in which the peptides are initially bound to the membrane, it is very difficult to achieve identical initial conditions (for example, the surface occupied by the peptides or lipids from the upper layer), due to the difference in the size and conformation of anisaxin and melittin. Detailed analysis and comparison by molecular dynamic simulations should take these differences into account, and the initial conditions should be controlled by measuring the corresponding surfaces and other factors that may affect the result.

6 KRATKI ŽIVOTOPIS

Obrazovanje:

- 2007. Tečaj Astrofizike i Astrobiologije
Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno – matematički fakultet
Ekstrasolarni planeti i astrobiologija
- 2012. Diplomski studij - Profesor matematike i fizike, diplomski rad: „Fononska pobuđenja i Kohnova anomalija“, mentorica izv. prof. dr. sc. Željana Bonačić Lošić
Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno – matematički fakultet

Radno iskustvo:

- 2016. – Asistent
Sveučilište u Splitu, Pomorski fakultet, polje matematika
Kolegiji: Matematika 1 i 2, Primijenjena matematika u navigaciji.
- 2013. – 2014. – Asistent
Sveučilište u Splitu, Kemijsko – tehnološki fakultet, polje fizika
Kolegiji: Fizika 1 i 2, Fizika za farmaceute, Vježbe iz fizike 1 i 2.
- 2012. – 2016. – Vanjski suradnik – Asistent
Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno – matematički fakultet, polje fizika
Kolegiji: Kvantna fizika 1 i 2, Matematičke osnove opće fizike, Fizika za biologe, Praktikum iz opće fizike 1, 2, 3 i 4.
- 2006. – 2016 - Nastavnik u osnovnoj školi
Povremene zamjene iz predmeta matematika i fizika

Nagrade:

- Najbolje ocijenjeni nastavnik Pomorskog fakulteta Sveučilišta u Splitu u ak. god. 2021./2022. od strane studenata (uz još jednog kolegu profesora)

Ostalo:

- Autor video predavanja iz kolegija Matematika 1 i Matematika 2
https://www.youtube.com/@matko_males

7 POPIS PUBLIKACIJA

Znanstveni radovi usko vezani s temom doktorata:

[1] M. Maleš and L. Zoranić, „Simulation Study of the Effect of Antimicrobial Peptide Associations on the Mechanism of Action with Bacterial and Eukaryotic Membranes”, *Membranes (Basel)*, vol. 12, no. 9, Sep. 2022, doi: 10.3390/membranes12090891.

[2] T. Rončević, M. Gerdol, M. Mardirossian, M. Maleš, S. Cvjetan, M. Benincasa, A. Maravić, G. Gajski, L. Krce, I. Aviani, J. Hrabar, Ž. Trumbić, M. Derks, A. Pallavicini, M. Weingarth, L. Zoranić, A. Tossi, I. Mladineo, „Anisaxins, helical antimicrobial peptides from marine parasites, kill resistant bacteria by lipid extraction and membrane disruption”, *Acta Biomater*, vol. 146, pp. 131–144, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.actbio.2022.04.025.

T. Rončević, M. Maleš, Y. Sonavane, F. Guida, S. Pacor, A. Tossi, L. Zoranić, “Influence of Glycine Substitutions on the Mode of Action of Membranolytic Helical Antimicrobial Peptides”, (rad u postupku recenzije).

Ostali znanstveni radovi:

[3] P. Matić, O. Bego, and M. Maleš, „Complex Hydrological System Inflow Prediction using Artificial Neural Network,” *Tehnicki Vjesnik*, vol. 29, no. 1, pp. 172–177, Feb. 2022, doi: 10.17559/TV-20200721133924.

[4] A. Russo, R. Mulić, I. Kolčić, M. Maleš, I. Jerončić Tomić, and L. Pezelj, “Longitudinal Study on the Effect of Onboard Service on Seafarers’ Health Statuses,” *Int J Environ Res Public Health*, vol. 20, no. 5, p. 4497, Mar. 2023, doi: 10.3390/ijerph20054497.

M. Maleš, F. Sokolić, T. Živković, „Application of the novel theoretical method for calculation of the out-of-plane vibrational frequencies and the corresponding amplitudes of the fluoroethene isotopomers“ (rad u postupku recenzije).

Predavanja i poster:

- Predavanje: „Calculations of vibrational spectra of molecules by Low Rank Modification method“ 9. znanstveni sastanak Hrvatskog fizikalnog društva, 2015. Umag, Hrvatska, knjiga sažetaka.

- Poster: „LRM calculation of vibrational spectra of fluoroethene isotopomers“, Second Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies, 2019. Split, Hrvatska.

8 LITERATURA

- [1] X. Kang *et al.*, “DRAMP 2.0, an updated data repository of antimicrobial peptides,” *Sci Data*, vol. 6, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41597-019-0154-y.
- [2] Jim O’Neill *et. al.*, “Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations,” 2016. [Online]. Available: <https://apo.org.au/node/63983>
- [3] A. H. Benfield and S. T. Henriques, “Mode-of-Action of Antimicrobial Peptides: Membrane Disruption vs. Intracellular Mechanisms,” *Front Med Technol*, vol. 2, no. December, pp. 25–28, 2020, doi: 10.3389/fmedt.2020.610997.
- [4] S. A. Baltzer and M. H. Brown, “Antimicrobial peptides-promising alternatives to conventional antibiotics,” *J Mol Microbiol Biotechnol*, vol. 20, no. 4, pp. 228–235, 2011, doi: 10.1159/000331009.
- [5] S. C. Mansour, O. M. Pena, and R. E. W. W. Hancock, “Host defense peptides: Front-line immunomodulators,” *Trends Immunol*, vol. 35, no. 9, pp. 443–450, 2014, doi: 10.1016/j.it.2014.07.004.
- [6] E. F. Haney, S. C. Mansour, and R. E. W. Hancock, “Antimicrobial peptides: An introduction,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1548, pp. 3–22, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6737-7_1.
- [7] A. bin Hafeez, X. Jiang, P. J. Bergen, and Y. Zhu, “Antimicrobial peptides: An update on classifications and databases,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 21, 2021, doi: 10.3390/ijms222111691.
- [8] A. C. C. Nascimento *et al.*, “Ocellatins: New antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae),” *Protein Journal*, vol. 23, no. 8, pp. 501–508, 2004, doi: 10.1007/s10930-004-7877-z.
- [9] C. D. Fjell, R. E.W. Hancock, and H. Jenssen, “Computer-Aided Design of Antimicrobial Peptides,” *Curr Pharm Anal*, vol. 6, no. 2, pp. 66–75, 2010, doi: 10.2174/157341210791202645.
- [10] D. Juretić *et al.*, “Knowledge-based computational methods for identifying or designing novel, non-homologous antimicrobial peptides,” *European Biophysics Journal*, vol. 40, no. 4, pp. 371–385, 2011, doi: 10.1007/s00249-011-0674-7.
- [11] D. Juretić, D. Vukičević, N. Ilić, N. Antcheva, and A. Tossi, “Computational design of highly selective antimicrobial peptides,” *J Chem Inf Model*, vol. 49, no. 12, pp. 2873–2882, 2009, doi: 10.1021/ci900327a.

- [12] M. H. Cardoso *et al.*, “Computer-Aided Design of Antimicrobial Peptides: Are We Generating Effective Drug Candidates?,” *Front Microbiol*, vol. 10, no. January, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2019.03097.
- [13] N. Kamech *et al.*, “Improving the selectivity of antimicrobial peptides from anuran skin,” *J Chem Inf Model*, vol. 52, no. 12, pp. 3341–3351, 2012, doi: 10.1021/ci300328y.
- [14] P. K. Meher, T. K. Sahu, V. Saini, and A. R. Rao, “Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou’s general PseAAC,” *Sci Rep*, vol. 7, no. October 2016, pp. 1–12, 2017, doi: 10.1038/srep42362.
- [15] J. Xu *et al.*, “Comprehensive assessment of machine learning-based methods for predicting antimicrobial peptides,” *Brief Bioinform*, vol. 22, no. 5, pp. 1–22, 2021, doi: 10.1093/bib/bbab083.
- [16] S. Ramazi, N. Mohammadi, A. Allahverdi, E. Khalili, and P. Abdolmaleki, “A review on antimicrobial peptides databases and the computational tools,” *Database*, vol. 2022. Oxford University Press, 2022. doi: 10.1093/database/baac011.
- [17] Q. Y. Zhang *et al.*, “Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential,” *Mil Med Res*, vol. 8, no. 1, pp. 1–25, 2021, doi: 10.1186/s40779-021-00343-2.
- [18] M. Dathe and T. Wieprecht, “Structural features of helical antimicrobial peptides: Potential to modulate activity on model membranes and biological cells,” *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1462, no. 1–2, pp. 71–87, 1999, doi: 10.1016/S0005-2736(99)00201-1.
- [19] D. Juretić *et al.*, “Designed peptide with a flexible central motif from ranatuerins adapts its conformation to bacterial membranes,” *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1860, no. 12, pp. 2655–2668, 2018, doi: 10.1016/j.bbamem.2018.10.005.
- [20] W. Jiang, Y. C. Lin, and Y. L. Luo, “Mechanical properties of anionic asymmetric bilayers from atomistic simulations,” *Journal of Chemical Physics*, vol. 154, no. 22, 2021, doi: 10.1063/5.0048232.
- [21] N. Malanovic *et al.*, “Phospholipid-driven differences determine the action of the synthetic antimicrobial peptide OP-145 on Gram-positive bacterial and mammalian membrane model systems,” *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1848, no. 10, pp. 2437–2447, 2015, doi: 10.1016/j.bbamem.2015.07.010.
- [22] J. Hong, X. Lu, Z. Deng, S. Xiao, B. Yuan, and K. Yang, “How melittin inserts into cell membrane: Conformational changes, inter-peptide cooperation, and disturbance on the membrane,” *Molecules*, vol. 24, no. 9, pp. 1–17, 2019, doi: 10.3390/molecules24091775.

- [23] J. M. Remington *et al.*, “Aggregation state of synergistic antimicrobial peptides,” *Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 11, pp. 9501–9506, 2020, doi: 10.1021/acs.jpcllett.0c02094.
- [24] L. T. Nguyen, E. F. Haney, and H. J. Vogel, “The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action,” *Trends Biotechnol*, vol. 29, no. 9, pp. 464–472, 2011, doi: 10.1016/j.tibtech.2011.05.001.
- [25] K. A. Brogden, “Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?,” *Nat Rev Microbiol*, vol. 3, no. 3, pp. 238–250, 2005, doi: 10.1038/nrmicro1098.
- [26] P. Pieta, J. Mirza, and J. Lipkowski, “Direct visualization of the alamethicin pore formed in a planar phospholipid matrix,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 52, pp. 21223–21227, 2012, doi: 10.1073/pnas.1201559110.
- [27] D. Allende, S. A. Simon, and T. J. McIntosh, “Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: Evidence for toroidal pores,” *Biophys J*, vol. 88, no. 3, pp. 1828–1837, 2005, doi: 10.1529/biophysj.104.049817.
- [28] F. Yoneyama *et al.*, “Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lactacin Q,” *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 53, no. 8, pp. 3211–3217, 2009, doi: 10.1128/AAC.00209-09.
- [29] Y. Shai, “Mode of action of membrane active antimicrobial peptides,” *Biopolymers - Peptide Science Section*, vol. 66, no. 4, pp. 236–248, 2002, doi: 10.1002/bip.10260.
- [30] D. I. Fernandez, A. P. le Brun, T. C. Whitwell, M. A. Sani, M. James, and F. Separovic, “The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 14, no. 45, pp. 15739–15751, 2012, doi: 10.1039/c2cp43099a.
- [31] J. D. F. Hale and R. E. W. Hancock, “Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria,” *Expert Rev Anti Infect Ther*, vol. 5, no. 6, pp. 951–959, 2007, doi: 10.1586/14787210.5.6.951.
- [32] C. B. Park, H. S. Kim, and S. C. Kim, “Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 244, no. 1, pp. 253–257, 1998, doi: 10.1006/bbrc.1998.8159.
- [33] C. Subbalakshmi and N. Sitaram, “Mechanism of antimicrobial action of indolicidin,” *FEMS Microbiol Lett*, vol. 160, no. 1, pp. 91–96, 1998, doi: 10.1016/S0378-1097(98)00008-1.

- [34] H. Sharma and R. Nagaraj, “Human β -defensin 4 with non-native disulfide bridges exhibit antimicrobial activity,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. 14–18, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0119525.
- [35] H. W. Huang, “Action of antimicrobial peptides: Two-state model,” *Biochemistry*, vol. 39, no. 29, pp. 8347–8352, 2000, doi: 10.1021/bi000946l.
- [36] C. H. Chen *et al.*, “Understanding and modelling the interactions of peptides with membranes: from partitioning to self-assembly,” *Curr Opin Struct Biol*, vol. 61, pp. 160–166, 2020, doi: 10.1016/j.sbi.2019.12.021.
- [37] R. Pokhrel *et al.*, “Molecular mechanisms of pore formation and membrane disruption by the antimicrobial lantibiotic peptide Mutacin 1140,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 21, no. 23, pp. 12530–12539, 2019, doi: 10.1039/c9cp01558b.
- [38] G. Pandit *et al.*, “Rationally designed antimicrobial peptides: Insight into the mechanism of eleven residue peptides against microbial infections,” *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1862, no. 4, p. 183177, 2020, doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183177.
- [39] P. la Rocca, P. C. Biggin, D. P. Tieleman, and M. S. P. Sansom, “Simulation studies of the interaction of antimicrobial peptides and lipid bilayers,” *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1462, no. 1–2, pp. 185–200, 1999, doi: 10.1016/S0005-2736(99)00206-0.
- [40] S. Tanizaki and M. Feig, “A generalized Born formalism for heterogeneous dielectric environments: Application to the implicit modeling of biological membranes,” *Journal of Chemical Physics*, vol. 122, no. 12, 2005, doi: 10.1063/1.1865992.
- [41] J. P. Ulmschneider and M. B. Ulmschneider, “Molecular Dynamics Simulations Are Redefining Our View of Peptides Interacting with Biological Membranes,” *Acc Chem Res*, vol. 51, no. 5, pp. 1106–1116, 2018, doi: 10.1021/acs.accounts.7b00613.
- [42] K. Vanommeslaeghe *et al.*, “CHARMM General Force Field (CGenFF): A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields,” *J Comput Chem*, vol. 31, no. 4, pp. 671–690, 2010, doi: 10.1002/jcc.21367.CHARMM.
- [43] A. Kukol, “Lipid models for united-atom molecular dynamics simulations of proteins,” *J Chem Theory Comput*, vol. 5, no. 3, pp. 615–626, 2009, doi: 10.1021/ct8003468.
- [44] E. Braun *et al.*, “Best Practices for Foundations in Molecular Simulations [Article v1.0],” *Living J Comput Mol Sci*, vol. 1, no. 1, pp. 1–28, 2019, doi: 10.33011/livecoms.1.1.5957.
- [45] D. P. Tieleman and M. S. P. Sansom, “Molecular dynamics simulations of antimicrobial peptides: From membrane binding to trans-membrane channels,” *Int J Quantum Chem*, vol. 83, no. 3-4 SPEC. ISS., pp. 166–179, 2001, doi: 10.1002/qua.1208.

- [46] E. Matyus, C. Kandt, and D. Tieleman, "Computer Simulation of Antimicrobial Peptides," *Curr Med Chem*, vol. 14, no. 26, pp. 2789–2798, 2007, doi: 10.2174/092986707782360105.
- [47] H. Leontiadou, A. E. Mark, and S. J. Marrink, "Antimicrobial Peptides in Action," *J. Amer. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 37, pp. 12156–12161, 2006.
- [48] D. Sengupta, H. Leontiadou, A. E. Mark, and S. J. Marrink, "Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder," *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1778, no. 10, pp. 2308–2317, 2008, doi: 10.1016/j.bbamem.2008.06.007.
- [49] H. W. Huang, F. Y. Chen, and M. T. Lee, "Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes," *Phys Rev Lett*, vol. 92, no. 19, pp. 1–4, 2004, doi: 10.1103/PhysRevLett.92.198304.
- [50] S. J. Ludtke, K. He, W. T. Heller, T. A. Harroun, L. Yang, and H. W. Huang, "Membrane Pores Induced by Magainin," *Biochemistry*, vol. 35, no. 43, pp. 13723–13728, 1996, doi: 10.1021/bi9620621.
- [51] L. Yang, T. A. Harroun, T. M. Weiss, L. Ding, and H. W. Huang, "Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores," *Biophys J*, vol. 81, no. 3, pp. 1475–1485, 2001, doi: 10.1016/S0006-3495(01)75802-X.
- [52] P. Petkov, E. Lilkova, N. Ilieva, and L. Litov, "Self-association of antimicrobial peptides: A molecular dynamics simulation study on bombinin," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 21, pp. 15–23, 2019, doi: 10.3390/ijms20215450.
- [53] R. Zou, X. Zhu, Y. Tu, J. Wu, and M. P. Landry, "Activity of Antimicrobial Peptide Aggregates Decreases with Increased Cell Membrane Embedding Free Energy Cost," *Biochemistry*, vol. 57, no. 18, pp. 2606–2610, 2018, doi: 10.1021/acs.biochem.8b00052.
- [54] T. Rončević *et al.*, "Antibacterial Activity Affected by the Conformational Flexibility in Glycine-Lysine Based α -Helical Antimicrobial Peptides," *J Med Chem*, vol. 61, no. 7, pp. 2924–2936, 2018, doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01831.
- [55] J. Johansson, G. H. Gudmundsson, M. E. Rottenberg, K. D. Berndt, and B. Agerberth, "Conformation-dependent Antibacterial Activity of the Naturally Occurring Human Peptide LL-37," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 6, pp. 3718–3724, 1998, doi: 10.1074/jbc.273.6.3718.
- [56] R. Chen and A. E. Mark, "The effect of membrane curvature on the conformation of antimicrobial peptides: Implications for binding and the mechanism of action," *European Biophysics Journal*, vol. 40, no. 4, pp. 545–553, 2011, doi: 10.1007/s00249-011-0677-4.
- [57] G. Wang, B. Mishra, R. F. Epanand, and R. M. Epanand, "High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its

- fragments,” *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1838, no. 9, pp. 2160–2172, 2014, doi: 10.1016/j.bbamem.2014.01.016.
- [58] L. Zhao, Z. Cao, Y. Bian, G. Hu, J. Wang, and Y. Zhou, “Molecular dynamics simulations of human antimicrobial peptide LL-37 in model POPC and POPG lipid bilayers,” *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 4, pp. 1–13, 2018, doi: 10.3390/ijms19041186.
- [59] X. Li, Y. Li, H. Han, D. W. Miller, and G. Wang, “Solution structures of human ll-37 fragments and NMR-based identification of a minimal membrane-targeting antimicrobial and anticancer region,” *J Am Chem Soc*, vol. 128, no. 17, pp. 5776–5785, 2006, doi: 10.1021/ja0584875.
- [60] G. Wang *et al.*, “Decoding the functional roles of cationic side chains of the major antimicrobial region of human cathelicidin LL-37,” *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 56, no. 2, pp. 845–856, 2012, doi: 10.1128/AAC.05637-11.
- [61] S. Jahangiri, M. Jafari, M. Arjomand, and F. Mehrnejad, “Molecular insights into the interactions of GF-17 with the gram-negative and gram-positive bacterial lipid bilayers,” *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 119, no. 11, pp. 9205–9216, 2018. doi: 10.1002/jcb.27187.
- [62] A. D. Cirac *et al.*, “The molecular basis for antimicrobial activity of pore-forming cyclic peptides,” *Biophys J*, vol. 100, no. 10, pp. 2422–2431, 2011, doi: 10.1016/j.bpj.2011.03.057.
- [63] Y. Wang, T. Zhao, D. Wei, E. Strandberg, A. S. Ulrich, and J. P. Ulmschneider, “How reliable are molecular dynamics simulations of membrane active antimicrobial peptides?,” *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1838, no. 9, pp. 2280–2288, 2014, doi: 10.1016/j.bbamem.2014.04.009.
- [64] D. Poger and A. E. Mark, “On the validation of molecular dynamics simulations of saturated and cis-monounsaturated phosphatidylcholine lipid bilayers: A comparison with experiment,” *J Chem Theory Comput*, vol. 6, no. 1, pp. 325–336, 2010, doi: 10.1021/ct900487a.
- [65] W. F. D. Bennett, C. K. Hong, Y. Wang, and D. P. Tieleman, “Antimicrobial Peptide Simulations and the Influence of Force Field on the Free Energy for Pore Formation in Lipid Bilayers,” *J Chem Theory Comput*, vol. 12, no. 9, pp. 4524–4533, 2016, doi: 10.1021/acs.jctc.6b00265.
- [66] J. P. Ulmschneider, “Charged Antimicrobial Peptides Can Translocate across Membranes without Forming Channel-like Pores,” *Biophys J*, vol. 113, no. 1, pp. 73–81, 2017, doi: 10.1016/j.bpj.2017.04.056.

- [67] R. Lipkin and T. Lazaridis, “Computational studies of peptide-induced membrane pore formation,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 372, no. 1726, 2017, doi: 10.1098/rstb.2016.0219.
- [68] B. S. Perrin and R. W. Pastor, “Simulations of Membrane-Disrupting Peptides I: Alamethicin Pore Stability and Spontaneous Insertion,” *Biophys J*, vol. 111, no. 6, pp. 1248–1257, 2016, doi: 10.1016/j.bpj.2016.08.014.
- [69] J. Pan, S. Tristram-Nagle, and J. F. Nagle, “Alamethicin aggregation in lipid membranes,” *Journal of Membrane Biology*, vol. 231, no. 1, pp. 11–27, Sep. 2009, doi: 10.1007/s00232-009-9199-8.
- [70] J. M. Leveritt, A. Pino-Angeles, and T. Lazaridis, “The structure of a melittin-stabilized pore,” *Biophys J*, vol. 108, no. 10, pp. 2424–2426, 2015, doi: 10.1016/j.bpj.2015.04.006.
- [71] A. Pino-Angeles, J. M. Leveritt, and T. Lazaridis, “Pore Structure and Synergy in Antimicrobial Peptides of the Magainin Family,” *PLoS Comput Biol*, vol. 12, no. 1, pp. 1–17, 2016, doi: 10.1371/journal.pcbi.1004570.
- [72] T. Wieprecht *et al.*, “Peptide Hydrophobicity Controls the Activity and Selectivity of Magainin 2 Amide in Interaction with Membranes,” *Biochemistry*, vol. 36, no. 20, pp. 6124–6132, 1997, doi: 10.1021/bi9619987.
- [73] R. W. Glaser, C. Sachse, U. H. N. Dürr, P. Wadhvani, and A. S. Ulrich, “Orientation of the antimicrobial peptide PGLa in lipid membranes determined from ¹⁹F-NMR dipolar couplings of 4-CF₃-phenylglycine labels,” *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 168, no. 1, pp. 153–163, 2004, doi: 10.1016/j.jmr.2004.02.008.
- [74] Y. Wang, C. H. Chen, D. Hu, M. B. Ulmschneider, and J. P. Ulmschneider, “Spontaneous formation of structurally diverse membrane channel architectures from a single antimicrobial peptide,” *Nat Commun*, vol. 7, pp. 1–9, 2016, doi: 10.1038/ncomms13535.
- [75] J. R. Marks, J. Placone, K. Hristova, and W. C. Wimley, “Spontaneous membrane-translocating peptides by orthogonal high-throughput screening,” *J Am Chem Soc*, vol. 133, no. 23, pp. 8995–9004, Jun. 2011, doi: 10.1021/ja2017416.
- [76] S. A. Wheaten, F. D. O. Ablan, B. L. Spaller, J. M. Trieu, and P. F. Almeida, “Translocation of cationic amphipathic peptides across the membranes of pure phospholipid giant vesicles,” *J Am Chem Soc*, vol. 135, no. 44, pp. 16517–16525, Nov. 2013, doi: 10.1021/ja407451c.
- [77] J. Cruz *et al.*, “A membrane-translocating peptide penetrates into bilayers without significant bilayer perturbations,” *Biophys J*, vol. 104, no. 11, pp. 2419–2428, 2013, doi: 10.1016/j.bpj.2013.04.043.

- [78] J. Liu, S. Xiao, J. Li, B. Yuan, K. Yang, and Y. Ma, “Molecular details on the intermediate states of melittin action on a cell membrane,” *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1860, no. 11, pp. 2234–2241, 2018, doi: 10.1016/j.bbamem.2018.09.007.
- [79] S. Zhang *et al.*, “Structure and formation mechanism of antimicrobial peptides temporin b- and l-induced tubular membrane protrusion,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 20, 2021, doi: 10.3390/ijms222011015.
- [80] S. Zhang, L. Fu, M. Wan, J. Song, L. Gao, and W. Fang, “Peripheral Antimicrobial Peptide Gomesin Induces Membrane Protrusion, Folding, and Laceration,” *Langmuir*, vol. 35, no. 40, pp. 13233–13242, 2019, doi: 10.1021/acs.langmuir.9b02175.
- [81] H. J. Woo and A. Wallqvist, “Spontaneous buckling of lipid bilayer and vesicle budding induced by antimicrobial peptide magainin 2: A coarse-grained simulation study,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 115, no. 25, pp. 8122–8129, 2011, doi: 10.1021/jp2023023.
- [82] N. Ilić *et al.*, “Selective antimicrobial activity and mode of action of adeptantins, glycine-rich peptide antibiotics based on anuran antimicrobial peptide sequences,” *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1828, no. 3, pp. 1004–1012, 2013, doi: 10.1016/j.bbamem.2012.11.017.
- [83] T. Rončević *et al.*, “Anisaxins, helical antimicrobial peptides from marine parasites, kill resistant bacteria by lipid extraction and membrane disruption,” *Acta Biomater*, vol. 146, pp. 131–144, Jul. 2022, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2022.04.025.
- [84] Haile J. M., *Molecular dynamics simulation - Elementary methods*, 1st ed. New York: John Wiley & Sons, inc., 1992.
- [85] H. J. C. Berendsen, *Simulating the physical world Hierarchical Modeling from Quantum Mechanics to Fluid Dynamics*. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. doi: 10.1017/CBO9780511815348.
- [86] Leach Andrew R, *Molecular modelling: Principles and applications*, 2nd ed. Dorchester: Pearson Education, 2001.
- [87] C. Oostenbrink, A. Villa, A. E. Mark, and W. F. van Gunsteren, “A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6,” *J Comput Chem*, vol. 25, no. 13, pp. 1656–1676, 2004, doi: 10.1002/jcc.20090.
- [88] B. Hess, H. Bekker, J. C. B. Herman, and G. E. M. F. Johannes, “LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations,” *J Comput Chem*, vol. 18, no. 12, pp. 1463–1472, 1998, doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H.

- [89] J. P. Ryckaert, G. Ciccotti, and H. J. C. Berendsen, “Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes,” *J Comput Phys*, vol. 23, no. 3, pp. 327–341, 1977, doi: 10.1016/0021-9991(77)90098-5.
- [90] J. Huang *et al.*, “CHARMM36m: An Improved Force Field for Folded and Intrinsically Disordered Proteins,” *Nat Methods*, vol. 14, no. 1, p. 71, Dec. 2017, doi: 10.1038/NMETH.4067.
- [91] N. Schmid *et al.*, “Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7,” *European Biophysics Journal*, vol. 40, no. 7, pp. 843–856, Jul. 2011, doi: 10.1007/s00249-011-0700-9.
- [92] D. H. De Jong *et al.*, “Improved Parameters for the Martini Coarse-Grained Protein Force Field,” *J Chem Theory Comput*, vol. 9, pp. 687–697, 2013, doi: 10.1021/ct300646g.
- [93] M. J. Abraham *et al.*, “Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers,” *SoftwareX*, vol. 1–2, pp. 19–25, 2015, doi: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
- [94] S. M. Mortuza, W. Zheng, C. Zhang, Y. Li, R. Pearce, and Y. Zhang, “Improving fragment-based ab initio protein structure assembly using low-accuracy contact-map predictions,” *Nat Commun*, vol. 12, no. 1, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-25316-w.
- [95] J. J. Lee *et al.*, “CHARMM-GUI Membrane Builder for Complex Biological Membrane Simulations with Glycolipids and Lipoglycans,” *J Chem Theory Comput*, vol. 15, no. 1, pp. 775–786, 2019, doi: 10.1021/acs.jctc.8b01066.
- [96] C. J. Knight and J. S. Hub, “MemGen: A general web server for the setup of lipid membrane simulation systems,” *Bioinformatics*, vol. 31, no. 17, pp. 2897–2899, 2015, doi: 10.1093/bioinformatics/btv292.
- [97] G. Lukat, J. Krüger, and B. Sommer, “APL@Voro: A Voronoi-Based Membrane Analysis Tool for GROMACS Trajectories,” *J Chem Inf Model*, vol. 53, no. 11, pp. 2908–2925, 2013, doi: 10.1021/ci400172g.
- [98] S. Buchoux, “FATSLiM: A fast and robust software to analyze MD simulations of membranes,” *Bioinformatics*, vol. 33, no. 1, pp. 133–134, 2017, doi: 10.1093/bioinformatics/btw563.
- [99] V. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, “VMD: Visual Molecular Dynamics,” *J Mol Graph*, vol. 14, pp. 33–38, 1996, doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- [100] K. Murzyn, T. Róg, and M. Pasenkiewicz-Gierula, “Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane,” *Biophys J*, vol. 88, no. 2, pp. 1091–1103, 2005, doi: 10.1529/biophysj.104.048835.

- [101] N. Malanovic and K. Lohner, “Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides,” *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1858, no. 5, pp. 936–946, 2016, doi: 10.1016/j.bbamem.2015.11.004.
- [102] A. Luchini and G. Vitiello, “Mimicking the mammalian plasma membrane: An overview of lipid membrane models for biophysical studies,” *Biomimetics*, vol. 6, no. 1. MDPI AG, pp. 1–18, Jan. 01, 2021. doi: 10.3390/biomimetics6010003.
- [103] D. Andreu and L. Rivas, “Animal Antimicrobial Peptides: An Overview,” *Biopolymers*, vol. 47, no. 6, pp. 415–433, 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<415::AID-BIP2>3.0.CO;2-D.
- [104] S. J. Kang, S. H. Nam, and B. J. Lee, “Engineering Approaches for the Development of Antimicrobial Peptide-Based Antibiotics,” *Antibiotics*, vol. 11, no. 10. MDPI, 2022. doi: 10.3390/antibiotics11101338.
- [105] I. Zelezetsky *et al.*, “Controlled alteration of the shape and conformational stability of alpha-helical cell-lytic peptides: effect on mode of action and cell specificity,” *Biochem J*, vol. 390, pp. 177–188, 2005, doi: 10.1042/BJ20042138.
- [106] Z. Jiang, A. I. Vasil, J. D. Hale, R. E. W. Hancock, M. L. Vasil, and R. S. Hodges, “Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides,” *Biopolymers*, vol. 90, no. 3, pp. 369–383, 2008, doi: 10.1002/BIP.20911.
- [107] E. M. Tytler, G. M. Anantharamaiah, D. E. Walker, V. K. Mishra, M. N. Palgunachari, and J. P. Segrest, “Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis,” *Biochemistry*, vol. 34, no. 13, pp. 4393–4401, 1995, doi: 10.1021/BI00013A031.
- [108] R. Gautier, D. Douguet, B. Antonny, and G. Drin, “HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties,” *Bioinformatics*, vol. 24, no. 18, pp. 2101–2102, 2008, doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTN392.
- [109] D. Eisenberg, R. M. Weiss, T. C. Terwilliger, and W. Wilcox, “Hydrophobic moments and protein structure,” in *Faraday Symposia of the Chemical Society*, 1982, vol. 17, pp. 109–120. doi: 10.1039/FS9821700109.
- [110] J. L. Fauchere and V. Pliška, “Hydrophobic parameters Π of amino acid side-chains from the partitioning of N-acetyl-amino acid amides,” *Eur J Med Chem*, vol. 18, no. 4, pp. 369–375, 1983.
- [111] R. O. Crooks, T. Rao, and J. M. Mason, “Truncation, randomization, and selection: Generation of a reduced length c-jun antagonist that retains high interaction stability,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 34, pp. 29470–29479, 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.221267.

- [112] E. L. Wu *et al.*, “E. coli outer membrane and interactions with OmpLA,” *Biophys J*, vol. 106, no. 11, pp. 2493–2502, 2014, doi: 10.1016/j.bpj.2014.04.024.
- [113] J. A. Yethon, D. E. Heinrichs, M. A. Monteiro, M. B. Perry, and C. Whitfield, “Involvement of waaY, waaQ, and waaP in the modification of Escherichia coli lipopolysaccharide and their role in the formation of a stable outer membrane,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 41, pp. 26310–26316, 1998, doi: 10.1074/jbc.273.41.26310.
- [114] S. Jo *et al.*, “Lipopolysaccharide membrane building and simulation,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1273, pp. 391–406, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2343-4_24.
- [115] S. Jo, J. B. Lim, J. B. Klauda, and W. Im, “CHARMM-GUI membrane builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes,” *Biophys J*, vol. 97, no. 1, pp. 50–58, 2009, doi: 10.1016/j.bpj.2009.04.013.
- [116] E. L. Wu *et al.*, “CHARMM-GUI membrane builder toward realistic biological membrane simulations,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 35, no. 27, pp. 1997–2004, 2014, doi: 10.1002/jcc.23702.
- [117] S. Jo, T. Kim, and W. Im, “Automated builder and database of protein/membrane complexes for molecular dynamics simulations,” *PLoS One*, vol. 2, no. 9, 2007, doi: 10.1371/journal.pone.0000880.
- [118] S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer, and W. Im, “CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM,” *J Comput Chem*, vol. 29, no. 11, pp. 1859–1865, Aug. 2008, doi: 10.1002/jcc.20945.
- [119] T. A. Wassenaar, K. Pluhackova, R. A. Böckmann, S. J. Marrink, and D. P. Tieleman, “Going backward: A flexible geometric approach to reverse transformation from coarse grained to atomistic models,” *J Chem Theory Comput*, vol. 10, no. 2, pp. 676–690, 2014, doi: 10.1021/ct400617g.
- [120] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein, “Comparison of simple potential functions for simulating liquid water,” *J Chem Phys*, vol. 79, no. 2, p. 926, 1998, doi: 10.1063/1.445869.
- [121] Y. Qi, H. I. Ingólfsson, X. Cheng, J. Lee, S. J. Marrink, and W. Im, “CHARMM-GUI Martini Maker for Coarse-Grained Simulations with the Martini Force Field,” *J Chem Theory Comput*, vol. 11, no. 9, pp. 4486–4494, 2015, doi: 10.1021/acs.jctc.5b00513.
- [122] P. C. Hsu *et al.*, “Charmm-gui martini maker for modeling and simulation of complex bacterial membranes with lipopolysaccharides,” *J Comput Chem*, vol. 38, no. 27, pp. 2354–2363, 2017, doi: 10.1002/jcc.24895.

- [123] S. J. Marrink, H. J. Risselada, S. Yefimov, D. P. Tieleman, and A. H. de Vries, “The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 111, no. 27, pp. 7812–7824, 2007, doi: 10.1021/jp071097f.
- [124] M. Parrinello and A. Rahman, “Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method,” *J Appl Phys*, vol. 52, no. 12, pp. 7182–7190, 1998, doi: 10.1063/1.328693.
- [125] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Van Gunsteren, A. Dinola, and J. R. Haak, “Molecular dynamics with coupling to an external bath,” *J Chem Phys*, vol. 81, no. 8, p. 3684, 1998, doi: 10.1063/1.448118.
- [126] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L. G. Pedersen, “A smooth particle mesh Ewald method,” *J Chem Phys*, vol. 103, no. 19, p. 8577, 1998, doi: 10.1063/1.470117.
- [127] R. P. Joosten *et al.*, “A series of PDB related databases for everyday needs,” *Nucleic Acids Res*, vol. 43, no. (Database issue), pp. D364–D368, 2015, doi: 10.1093/NAR/GKQ1105.
- [128] W. Kabsch and C. Sander, “Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features,” *Biopolymers*, vol. 22, no. 12, pp. 2577–2637, 1983, doi: 10.1002/BIP.360221211.
- [129] S. Reißer, E. Strandberg, T. Steinbrecher, and A. S. Ulrich, “3D hydrophobic moment vectors as a tool to characterize the surface polarity of amphiphilic peptides,” *Biophys J*, vol. 106, no. 11, pp. 2385–2394, 2014, doi: 10.1016/j.bpj.2014.04.020.
- [130] D. Poger, W. F. Van Gunsteren, and A. E. Mark, “A new force field for simulating phosphatidylcholine bilayers,” *J Comput Chem*, vol. 31, no. 6, pp. 1117–1125, 2010, doi: 10.1002/jcc.21396.
- [131] T. J. Piggot, D. A. Holdbrook, and S. Khalid, “Electroporation of the E. coli and S. aureus membranes: Molecular dynamics simulations of complex bacterial membranes,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 115, no. 45, pp. 13381–13388, 2011, doi: 10.1021/jp207013v.
- [132] I. Chandrasekhar *et al.*, “A consistent potential energy parameter set for lipids: Dipalmitoylphosphatidylcholine as a benchmark of the GROMOS96 45A3 ff,” *European Biophysics Journal*, vol. 32, no. 1, pp. 67–77, 2003, doi: 10.1007/s00249-002-0269-4.
- [133] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Gunsteren, and J. Hermans, “Interaction models for water in relation to protein hydration,” *The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry*, vol. 14, pp. 331–342, 1981, doi: 10.1007/978-94-015-7658-1_21.
- [134] W. Zhao, T. Róg, A. A. Gurtovenko, I. Vattulainen, and M. Karttunen, “Atomic-scale structure and electrostatics of anionic palmitoylloleoylphosphatidylglycerol lipid bilayers

- with Na⁺ counterions,” *Biophys J*, vol. 92, no. 4, pp. 1114–1124, 2007, doi: 10.1529/biophysj.106.086272.
- [135] J. Domański, P. J. Stansfeld, M. S. P. Sansom, and O. Beckstein, “Lipidbook: A public repository for force-field parameters used in membrane simulations,” *Journal of Membrane Biology*, vol. 236, no. 3, pp. 255–258, 2010, doi: 10.1007/s00232-010-9296-8.
- [136] P. R. Cullis, D. B. Fenske, and M. J. Hope, “Physical properties and functional roles of lipids in membranes,” *New Comprehensive Biochemistry*, vol. 20, pp. 1–41, 1991, doi: 10.1016/S0167-7306(08)60329-4.
- [137] C.-H. Huang and S. Li, “Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1422, no. 3, pp. 273–307, 1999, doi: 10.1016/s0005-2736(99)00099-1.
- [138] J. M. Boggs and B. Tiimmler, “Interdigitated gel phase bilayers formed by unsaturated synthetic and bacterial glycerolipids in the presence of polymyxin B and glycerol,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1145, no. 1, pp. 42–50, 1993, doi: 10.1016/0005-2736(93)90379-e.
- [139] Y.-H. Chen, J. T. Yang, and K. H. Chaus, “Determination of the Helix and beta Form of Proteins in Aqueous Solution by Circular Dichroism?,” *Biochemistry*, vol. 13, no. 16, pp. 3350–3359, 1974, doi: 10.1021/bi00713a027.
- [140] R. Bruno *et al.*, “Worms’ antimicrobial peptides,” *Marine Drugs*, vol. 17, no. 9. MDPI AG, 2019. doi: 10.3390/md17090512.
- [141] M. T. Lee, T. L. Sun, W. C. Hung, and H. W. Huang, “Process of inducing pores in membranes by melittin,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, no. 35, pp. 14243–14248, 2013, doi: 10.1073/pnas.1307010110.
- [142] K. P. Santo, S. J. Irudayam, and M. L. Berkowitz, “Melittin creates transient pores in a lipid bilayer: Results from computer simulations,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 117, no. 17, pp. 5031–5042, 2013, doi: 10.1021/jp312328n.
- [143] N. Asthana, S. P. Yadav, and J. K. Ghosh, “Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin: A leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 53, pp. 55042–55050, 2004, doi: 10.1074/jbc.M408881200.
- [144] P. Askari, M. H. Namaei, K. Ghazvini, and M. Hosseini, “In vitro and in vivo toxicity and antibacterial efficacy of melittin against clinical extensively drug-resistant bacteria,” *BMC Pharmacol Toxicol*, vol. 22, no. 1, 2021, doi: 10.1186/s40360-021-00503-z.
- [145] I. Kabelka and R. Vácha, “Advances in Molecular Understanding of α -Helical Membrane-Active Peptides,” *Accounts of Chemical Research*, vol. 54, no. 9, pp. 2196–2204, 2021. doi: 10.1021/acs.accounts.1c00047.

- [146] I. Kabelka and R. Vácha, “Optimal conditions for opening of membrane pore by amphiphilic peptides,” *Journal of Chemical Physics*, vol. 143, no. 24, 2015, doi: 10.1063/1.4933229.
- [147] C. D. Fjell, J. A. Hiss, R. E. W. Hancock, and G. Schneider, “Designing antimicrobial peptides: Form follows function,” *Nat Rev Drug Discov*, vol. 11, no. 1, pp. 37–51, 2012, doi: 10.1038/nrd3591.
- [148] M. T. Lee, W. C. Hung, F. Y. Chen, and H. W. Huang, “Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 13, pp. 5087–5092, 2008, doi: 10.1073/pnas.0710625105.
- [149] H. W. Huang and N. E. Charron, “Understanding membrane-active antimicrobial peptides,” *Q Rev Biophys*, vol. 50, p. e10, Jan. 2017, doi: 10.1017/S0033583517000087.
- [150] M. A. Sani and F. Separovic, “How Membrane-Active Peptides Get into Lipid Membranes,” *Acc Chem Res*, vol. 49, no. 6, pp. 1130–1138, 2016, doi: 10.1021/acs.accounts.6b00074.
- [151] W. C. Wimley and K. Hristova, “Antimicrobial peptides: Successes, challenges and unanswered questions,” *Journal of Membrane Biology*, vol. 239, no. 1–2, pp. 27–34, 2011, doi: 10.1007/s00232-011-9343-0.
- [152] N. Kučerka, M. P. Nieh, and J. Katsaras, “Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature,” *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1808, no. 11, pp. 2761–2771, 2011, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.07.022.
- [153] F. Ramos-Martín, C. Herrera-León, V. Antonietti, P. Sonnet, C. Sarazin, and N. D’amelio, “Antimicrobial peptide k11 selectively recognizes bacterial biomimetic membranes and acts by twisting their bilayers,” *Pharmaceuticals*, vol. 14, no. 1, pp. 1–22, 2021, doi: 10.3390/ph14010001.
- [154] L. Zhang, P. Dhillon, H. Yan, S. Farmer, and R. E. W. Hancock, “Interactions of Bacterial Cationic Peptide Antibiotics with Outer and Cytoplasmic Membranes of *Pseudomonas aeruginosa*,” *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 44, no. 12, p. 3317, 2000, doi: 10.1128/AAC.44.12.3317-3321.2000.
- [155] H. Gong *et al.*, “Structural Disruptions of the Outer Membranes of Gram-Negative Bacteria by Rationally Designed Amphiphilic Antimicrobial Peptides,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 13, no. 14, pp. 16062–16074, 2021, doi: 10.1021/ACSAMI.1C01643/SUPPL_FILE/AM1C01643_SI_001.PDF.
- [156] R. E. W. Hancock and D. S. Chapple, “Peptide Antibiotics,” *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 43, no. 6, pp. 1317–1323, 1999, doi: 10.1128/AAC.43.6.1317.

- [157] D. Weerakoon, K. Petrov, C. Pedebos, and S. Khalid, “Polymyxin B1 within the E. coli cell envelope: insights from molecular dynamics simulations,” *Biophys Rev*, vol. 13, no. 6, pp. 1061–1070, 2021, doi: 10.1007/s12551-021-00869-8.
- [158] S. J. Marrink, V. Corradi, P. C. T. Souza, H. I. Ingólfsson, D. P. Tieleman, and M. S. P. Sansom, “Computational Modeling of Realistic Cell Membranes,” *Chem Rev*, vol. 119, no. 9, pp. 6184–6226, 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00460.
- [159] A. Boags, P. C. Hsu, F. Samsudin, P. J. Bond, and S. Khalid, “Progress in Molecular Dynamics Simulations of Gram-Negative Bacterial Cell Envelopes,” *Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 8, no. 11, pp. 2513–2518, 2017, doi: 10.1021/acs.jpcclett.7b00473.
- [160] J. P. Ulmschneider, J. C. Smith, M. B. Ulmschneider, A. S. Ulrich, and E. Strandberg, “Reorientation and dimerization of the membrane-bound antimicrobial peptide pglA from microsecond all-atom MD simulations,” *Biophys J*, vol. 103, no. 3, pp. 472–482, 2012, doi: 10.1016/j.bpj.2012.06.040.
- [161] R. Zou, X. Zhu, Y. Tu, J. Wu, and M. P. Landry, “Activity of Antimicrobial Peptide Aggregates Decreases with Increased Cell Membrane Embedding Free Energy Cost,” *Biochemistry*, vol. 57, no. 18, pp. 2606–2610, May 2018, doi: 10.1021/ACS.BIOCHEM.8B00052/SUPPL_FILE/BI8B00052_SI_001.PDF.
- [162] A. Tossi, L. Sandri, and A. Giangaspero, “Amphipathic, Alpha-Helical Antimicrobial Peptides,” *Biopolymers (Peptide Science)*, vol. 55, pp. 4–30, 2000, doi: [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1%3C4::AID-BIP30%3E3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1%3C4::AID-BIP30%3E3.0.CO;2-M).
- [163] B. Bechinger and K. Lohner, “Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1758, no. 9, pp. 1529–1539, 2006, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2006.07.001.
- [164] D. Juretić *et al.*, “The spectrum of design solutions for improving the activity-selectivity product of peptide antibiotics against multidrug-resistant bacteria and prostate cancer PC-3 cells,” *Molecules*, vol. 25, no. 15, 2020, doi: 10.3390/molecules25153526.
- [165] A. A. Robles-loaiza *et al.*, “Traditional and Computational Screening of Non-Toxic Peptides and Approaches to Improving Selectivity,” *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 15, no. 3, 2022, doi: 10.3390/ph15030323.
- [166] N. Kučerka, Y. Liu, N. Chu, H. I. Petrache, S. Tristram-Nagle, and J. F. Nagle, “Structure of fully hydrated fluid phase DMPC and DLPC lipid bilayers using x-ray scattering from oriented multilamellar arrays and from unilamellar vesicles,” *Biophys J*, vol. 88, no. 4, pp. 2626–2637, 2005, doi: 10.1529/biophysj.104.056606.
- [167] N. Greenfield and G. D. Fasman, “Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation,” *Biochemistry*, vol. 8, no. 10, pp. 4108–4116, 1969, doi: 10.1021/bi00838a031.

- [168] W. C. Johnson, “Protein Secondary Structure and Circular Dichroism: A Practical Guide,” *Proteins*, vol. 7, no. 3, pp. 205–214, 1990, doi: 10.1002/prot.340070302.
- [169] M. D. Bruch, M. M. Dhingra, and L. M. Gierasch, “Side Chain-Backbone Hydrogen Bonding Contributes to Helix Stability in Peptides Derived From an α -Helical Region of Carboxypeptidase A,” *Proteins*, vol. 10, no. 2, pp. 130–139, 1991, doi: 10.1002/prot.340100206.
- [170] N. H. Andersen, Z. Liu, and K. S. Prickett, “Efforts toward deriving the CD spectrum of a 310 helix in aqueous medium,” *FEBS Lett*, vol. 399, no. 1–1, pp. 47–52, 1996, doi: 10.1016/s0014-5793(96)01279-3.
- [171] I. Zelezetsky, U. Pag, H. G. Sahl, and A. Tossi, “Tuning the biological properties of amphipathic α -helical antimicrobial peptides: Rational use of minimal amino acid substitutions,” *Peptides (N.Y.)*, vol. 26, no. 12, pp. 2368–2376, 2005, doi: 10.1016/j.peptides.2005.05.002.
- [172] C. Avitabile, L. D. D’Andrea, and A. Romanelli, “Circular Dichroism studies on the interactions of antimicrobial peptides with bacterial cells,” *Sci Rep*, vol. 4, 2014, doi: 10.1038/srep04293.
- [173] F. Separovic, D. W. Keizer, and M.-A. Sani, “In-cell Solid-State NMR Studies of Antimicrobial Peptides,” *Front Med Technol*, vol. 2, 2020, doi: 10.3389/fmedt.2020.610203.
- [174] S. Riniker, “Fixed-Charge Atomistic Force Fields for Molecular Dynamics Simulations in the Condensed Phase: An Overview,” *J Chem Inf Model*, vol. 58, no. 3, pp. 565–578, Mar. 2018, doi: 10.1021/acs.jcim.8b00042.
- [175] T. F. D. Silva *et al.*, “The Impact of Using Single Atomistic Long-Range Cutoff Schemes with the GROMOS 54A7 Force Field,” *J Chem Theory Comput*, vol. 14, no. 11, pp. 5823–5833, 2018, doi: 10.1021/acs.jctc.8b00758.
- [176] O. F. Lange, D. Van Der Spoel, and B. L. De Groot, “Scrutinizing molecular mechanics force fields on the submicrosecond timescale with NMR Data,” *Biophys J*, vol. 99, no. 2, pp. 647–655, 2010, doi: 10.1016/j.bpj.2010.04.062.
- [177] W. F. van Gunsteren *et al.*, “On the Effect of the Various Assumptions and Approximations used in Molecular Simulations on the Properties of Bio-Molecular Systems,” *ChemPhysChem*, vol. 22, no. 3, pp. 264–282, 2021, doi: 10.1002/cphc.202000968.
- [178] T. J. Piggot, Á. Piñeiro, and S. Khalid, “Molecular dynamics simulations of phosphatidylcholine membranes: A comparative force field study,” *J Chem Theory Comput*, vol. 8, no. 11, pp. 4593–4609, 2012, doi: 10.1021/ct3003157.

9 PRILOZI

9.1 Kreiranje početnih struktura

9.1.1 Adepantin-1

Početna struktura adepantina-1 dobivena je pomoću C-QUARK poslužitelja (<https://zhanggroup.org/C-QUARK/> pristup u siječnju 2022.) [94]. Početne konformacije za AA simulacije pripremljene su pomoću CHARMM-GUI (<https://www.charmm-gui.org/> pristup u siječnju 2022.) *Membrane Buildera* [115], [116], dok su početne konformacije za CG simulacije kreirane pomoću CHARMM-GUI *Martini Bilayer Makera* [121], [122].

I. Kreiranje početnih struktura u AA-1 simulacijama

1. Centriranje peptida u simulacijskoj kutiji:

```
gmx editconf -f adepantin.pdb -center 0 0 0 -o adepantin_centriran.gro
```

2. Poravnavanje peptida paralelno x-y ravnini:

```
gmx editconf -f adepantin_centriran.gro -o adepantin_centriran_princ.pdb -princ
```

(poravnava peptid tako da mu se os uzvojnice podudara sa „principal axis“ sistema, a to je za nove verzije gromacsa x-os)

3. CHARMM-GUI poslužitelj zahtijeva .pdb strukturni file u kojem svaki atom ima „chain“ oznaku. Jedan od načina da se dobije chain oznaka je otvoriti strukturnu datoteku u VMD-u i sačuvati koordinate (File – Save coordinates) kao novu [adepantin_centriran_princ_chain.pdb](#) datoteku, u njoj će automatski biti dodana chain oznaka „X“ na sve atome peptida.


4. Na web stranici <https://www.charmm-gui.org/?doc=input/membrane.bilayer> odabrati „Protein/Membrane System“ i uploadati adepantin_centriran_princ_chain.pdb datoteku.

● Protein/Membrane System

Download PDB File: Download Source: ▾

Upload PDB File: adepantin_c...c_chain.pdb

PDB Format: PDB PDBx/mmCIF CHARMM

Check/Correct PDB Format 

5. Pdb info:

Bilayer Builder

PDB Info | STEP 1 | STEP 2 | STEP 3 | STEP 4 | STEP 5 | STEP 6

Title
PDB ID: ADEPANTIN_CENTRIRAN_PRINC_CHAIN
Type: Protein
Experimental Method: Unknown

Model/Chain Selection Option:
Click on the chains you want to select.

Type	SEGID	PDB ID	Residue ID		Engineered Residues
			First	Last	
<input checked="" type="checkbox"/> Protein	PROA	X	1	24	NHE

6. Dodavanje terminusa na peptid. Želimo $-NH_2$ na C kraju pa biramo „CT2“, a N-kraj ostavljamo istim (pošto je prva aminokiselina Gly, biramo „GLYP“)

PDB Manipulation Options:

Renaming Engineered Residues: ?
Rename NHE to Leave blank to remove

Upload CHARMM top & par for engineered residue:
Topology: No file chosen
Parameter: No file chosen

Terminal group patching: ?
First Last
PROA Cyclic peptide?

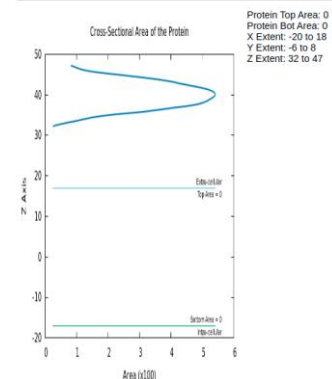
7. Orijehtacija i položaj peptida. Pošto smo peptid već orijentirali kako želimo, koristit ćemo „Use PDB orientation“. U datoteci koju smo uploadali peptid se nalazi u centru simulacijske kutije. Želimo ga translahirati po z-osi, tako da se nakon dodavanja membrane nalazi iznad nje ~2 nm

Orientation Options: ?

- Use PDB Orientation This option is suggested for an oriented structure from <http://opm.phar.umich.edu>
- Align the First Principal Axis Along Z This option is suggested for small helical bundle or homo-oligomer.
- Align a Vector (Two Atoms) Along Z This option is suggested for an irregular, hetero-oligomer.
- Use PPM Server This option submits an input structure on http://opm.phar.umich.edu/ppm_server It may take some minutes depending on protein size.

Positioning Options:

- Rotate Molecule respect to the X axis Degree
- Rotate Molecule respect to the Y axis Degree
- Translate Molecule along Z axis Angstrom
- Flip Molecule along the Z axis

Calculated Cross Sectional Area:

8. Količina vode određuje veličinu simulacijske kutije. Treba staviti dovoljno vode kako bi se smanjili periodički efekti, ali ne previše, jer više atoma znači dulje računalno vrijeme za simulaciju.

1. Box Type: (Currently, only CHARMM, NAMD, and GROMACS support the hexagonal box)
2. Length of Z based on:
- Water thickness (Minimum water height on top and bottom of the system)
 - Hydration number (Number of water molecules per one lipid molecule)
3. Length of XY based on:
- Ratios of lipid components
 - Numbers of lipid components
- XY Dimension Ratio:
(The system size along the X and Y must be the same)

9. Dodavanje lipida

POPE	0	16:0 / 18:1	[image]	<input type="text" value="96"/>	<input type="text" value="96"/>	<input type="text" value="58.8"/>
POPG	-1	16:0 / 18:1	[image]	<input type="text" value="32"/>	<input type="text" value="32"/>	<input type="text" value="62.0"/>

10. Dodavanje iona

Component Building Options:

Include Ions

Ion Placing Method:

Basic Ion Types

More Ion Types

Formula	Cation	Anion	Concentration	Neutralizing
KCl	K ⁺	Cl ⁻	<input type="text" value="0.15"/>	<input checked="" type="radio"/>

Ion	Count
K ⁺	125
Cl ⁻	66

Please note that the ion count is an approximation based on geometry. The real number will be calculated in the next step.

11. Odabir polja sila, programa za simuliranje, ansambla i temperature

Force Field Options:

WYF parameter for cation-pi interactions

Hydrogen mass repartitioning

Input Generation Options:

More CHARMM minimization during input generation

NAMD

GROMACS

AMBER

OpenMM

CHARMM/OpenMM

GENESIS

Desmond

LAMMPS

Tinker

Equilibration Options:

P21 image transformation (only available for CHARMM)

CHARMM DOMDEC (only available for CHARMM)

Generate grid information for PME FFT automatically

Explicit grid information for PME FFT

X
Y
Z

NPT ensemble

NPAT ensemble

NPgT ensemble

Surface Tension (dyne/cm)

Temperature: K

12. Minimizacija

step6.0_minimization.mdp:

```
define                = -DPOSRES -DPOSRES_FC_BB=4000.0 -DPOSRES_FC_SC=2000.0 -
DPOSRES_FC_LIPID=1000.0 -DDIHRES -DDIHRES_FC=1000.0
integrator            = steep
emtol                 = 1000.0
nsteps                = 15000
nstlist               = 10
cutoff-scheme         = Verlet
rlist                 = 1.2
vdwtype               = Cut-off
vdw-modifier          = Force-switch
rvdw_switch           = 1.0
rvdw                  = 1.2
coulombtype           = PME
rcoulomb              = 1.2
;
constraints           = h-bonds
constraint_algorithm   = LINCS
```

```
gmx grompp -f step6.0_minimization.mdp -o step6.0_minimization.tpr -c
step5_input.gro -r step5_input.gro -p topol.top -n index.ndx
```

```
gmx mdrun -v -deffnm step6.0_minimization
```

13. Ekvilibraciju i produkciju obavljamo na superračunalu pa na njega prebacimo cijelu mapu „gromacs“. Charmm-gui daje već gotove .mdp datoteke za ekvilibraciju u šest koraka. Pokrećemo ih pomoću skripte:

ekvilibracija.sh:

```
#!/bin/sh
#SBATCH --job-name=adepantin1_POPEPOPG
#SBATCH --nodes=4
#SBATCH --ntasks=24
#SBATCH --cpus-per-task=1
#SBATCH --exclusive
#SBATCH --partition=computes_thin
#SBATCH --time=10:00:00

cnt=1
cntmax=6

while [ $cnt -le $cntmax ]
do
    pcnt=$(( $cnt - 1 ))
    if [ $cnt -eq 1 ]
    then
        mpirun gmx_mpi grompp -f step6."$cnt"_equilibration.mdp -o
step6."$cnt"_equilibration.tpr -c step6."$pcnt"_minimization.gro -r step5_input.gro -n
index.ndx -p topol.top
        mpirun gmx_mpi mdrun -v -deffnm step6."$cnt"_equilibration
    else
        mpirun gmx_mpi grompp -f step6."$cnt"_equilibration.mdp -o
step6."$cnt"_equilibration.tpr -c step6."$pcnt"_equilibration.gro -r step5_input.gro -n
index.ndx -p topol.top
        mpirun gmx_mpi mdrun -v -deffnm step6."$cnt"_equilibration
    fi
    ((cnt+=1))
done
```

Na superračunalu uvijek treba najprije učitati u memoriju gromacs verziju u kojoj ćemo raditi:

```
module load gromacs/2021.3
```

I pokrenuti skriptu:

```
sbatch ekvilibracija.sh
```

14. Simulacija

step7_production.mdp:

```
integrator          = md
dt                  = 0.002
nsteps              = 50000000 ; 100ns
nstxout             = 12500000 ; trr svakih 25ns
nstvout             = 12500000 ; trr svakih 25ns
;nstfout            = 50000
;nstcalcenergy      = 100
nstenergy           = 10000 ; svakih 20ps
nstlog              = 500000 ; md log svakih 1ns
nstxtcout           = 25000 ; xtc svakih 50ps
;
cutoff-scheme       = verlet
nstlist             = 20
rlist               = 1.2
vdwtype             = Cut-off
vdw-modifier        = Force-switch
rvdw_switch         = 1.0
rvdw                = 1.2
coulombtype         = PME
rcoulomb            = 1.2
;
tcoupl              = Nose-Hoover
tc_grps             = SOLU MEMB SOLV
tau_t               = 1.0 1.0 1.0
ref_t               = 310 310 310
;
pcoupl              = Parrinello-Rahman
pcoupltype          = semiisotropic
tau_p               = 5.0
compressibility     = 4.5e-5 4.5e-5
ref_p               = 1.0 1.0
;
constraints         = h-bonds
constraint_algorithm = LINCS
continuation        = yes
;
nstcomm             = 100
comm_mode           = linear
comm_grps           = SOLU_MEMB SOLV
```

Skripta mdrun1.sh:

```
#!/bin/sh
#SBATCH --job-name=pepg256
#SBATCH --nodes=12
#SBATCH --ntasks-per-node=24
#SBATCH --partition=computes_thin
#SBATCH --time=100:00:00

gmx_mpi grompp -f step7_production.mdp -c step6.6_equilibration.gro -t
step6.6_equilibration.cpt -p topol.top -o md1.tpr -n index.ndx -maxwarn 2

mpirun gmx_mpi mdrun -v -deffnm md1 -dlb yes

cnt=1
```

```

cntmax=3

while [ $cnt -le $cntmax ]
do
  pcnt=$((cnt-1))
  cntnovi=$((cnt+1))
  gmx_mpi convert-tpr -s md"$cnt".tpr -extend 100000 -o md"$cntnovi".tpr
  mpirun gmx_mpi mdrun -s md"$cntnovi".tpr -v -cpi md"$cnt".cpt -cpo
  md"$cntnovi".cpt -noappend -dlb yes

  ((cnt+=1))
done

module load gromacs/2021.3
sbatch mdrun1.sh

```

Produživanje simulacije:

mdrun2.sh:

```

#!/bin/sh
#SBATCH --job-name=pepg256
#SBATCH --nodes=12
#SBATCH --ntasks-per-node=24
#SBATCH --partition=computes_thin
#SBATCH --time=100:00:00

cnt=4
cntmax=6

while [ $cnt -le $cntmax ]
do
  pcnt=$((cnt-1))
  cntnovi=$((cnt+1))

  gmx_mpi convert-tpr -s md"$cnt".tpr -extend 100000 -o md"$cntnovi".tpr

  mpirun gmx_mpi mdrun -s md"$cntnovi".tpr -v -cpi md"$cnt".cpt -cpo
  md"$cntnovi".cpt -noappend -dlb yes

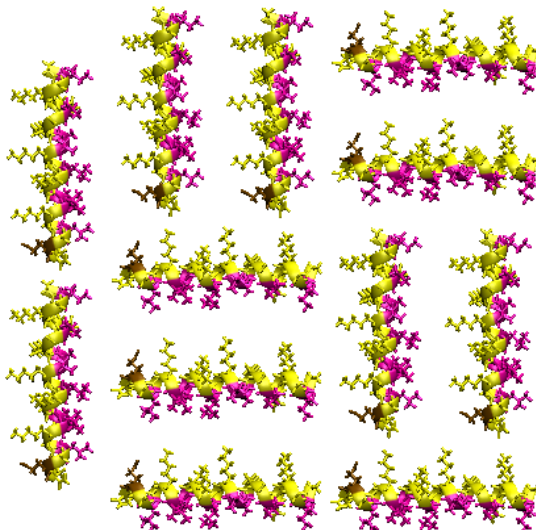
  ((cnt+=1))
done

module load gromacs/2021.3
sbatch mdrun2.sh

```

II. Kreiranje početnih struktura u AA-12 simulacijama

1. Želimo ih organizirati na sljedeći način:



Slika 69 Inicijalni raspored adepantina-1 u simulacijama AA-12a

Već imamo datoteku `adepantin_centriran_princ_chain.gro` u kojoj je os adepantina paralelna sa x-osi. Trebamo još jednu datoteku u kojoj će biti okomit na x-os:

```
gmx editconf -f adepantin_centriran_princ_chain.gro -rotate 0 0 90 -o
adepantin_centriran_princ_chain_rotiran90.gro
```

2. Kreiranje 12 datoteka sa transliranim adepantinima:

Skripta konstrukcija_12_kom.sh:

```
#!/bin/bash
gmx editconf -f adepantin_centriran_princ_chain.gro -translate -1 0 0 -o
adepantin_translate_-1_0_0.gro
gmx editconf -f adepantin_centriran_princ_chain.gro -translate -1 -2 0 -o
adepantin_translate_-1_-2_0.gro
gmx editconf -f adepantin_centriran_princ_chain.gro -translate -1 -4 0 -o
adepantin_translate_-1_-4_0.gro
gmx editconf -f adepantin_centriran_princ_chain.gro -translate 3 -4 0 -o
adepantin_translate_3_-4_0.gro
gmx editconf -f adepantin_centriran_princ_chain.gro -translate 3 2 0 -o
adepantin_translate_3_2_0.gro
gmx editconf -f adepantin_centriran_princ_chain.gro -translate 3 4 0 -o
adepantin_translate_3_4_0.gro
gmx editconf -f adepantin_centriran_princ_chain_rotiran90.gro -translate 0 3 0 -o
adepantin_rotiran90_translate_0_3_0.gro
gmx editconf -f adepantin_centriran_princ_chain_rotiran90.gro -translate -2 3 0 -o
adepantin_rotiran90_translate_-2_3_0.gro
gmx editconf -f adepantin_centriran_princ_chain_rotiran90.gro -translate 2 -1 0 -o
adepantin_rotiran90_translate_2_-1_0.gro
gmx editconf -f adepantin_centriran_princ_chain_rotiran90.gro -translate 4 -1 0 -o
adepantin_rotiran90_translate_4_-1_0.gro
gmx editconf -f adepantin_centriran_princ_chain_rotiran90.gro -translate -4 2 0 -o
adepantin_rotiran90_translate_-4_2_0.gro
gmx editconf -f adepantin_centriran_princ_chain_rotiran90.gro -translate -4 -2 0 -o
adepantin_rotiran90_translate_-4_-2_0.gro
```

```
bash konstrukcija_12_kom.sh
```

3. Tih 12 strukturnih datoteka spojimo u jednu:

```
cat adepantin* > adepantin1_12kom.gro
```

Uvijek pri kreiranju nove .gro datoteke moramo provjeriti (izmijeniti) ukupan broj atoma i manualno izbrisati suvišne retke.

4. U konačnoj datoteci `adepantin1_12kom.gro` svih 12 peptida ima istu „chain“ oznaku. Trebamo to izmijeniti tako da svaki peptid ima svoju posebnu „chain“ oznaku. To radimo pomoću niže navedene skripte. Za potrebe skripte datoteku treba preimenovati u `12kom0.pdb`:

```
gmx editconf -f adepantin1_12kom.gro -o 12kom0.pdb
```

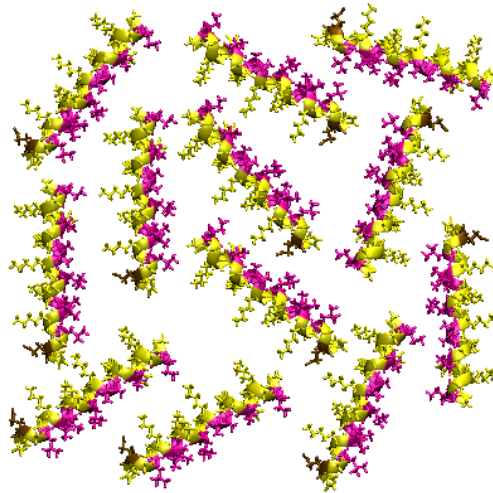
Skripta mijenjanje_chain_oznaka.sh:

```
#!/bin/bash
arr=(A B C D E F G H I J K L)
broj1=2
for i in ${!arr[@]}
do
#ukupan broj atoma u adepantinu-1 je 347
broj2=$((broj1+346))
broj3=$((i+1))
awk 'BEGIN{ OFS=FS="" } FNR>='$broj1' && FNR <='$broj2' && $22=="X"{ $22="'${arr[i]}'"}1'
12kom$i.pdb > 12kom$broj3.pdb
broj1=$((broj1+347))
done
```

```
bash mijenjanje_chain_oznaka.sh
```

Konačna datoteka s 12 peptida je `12kom12.pdb`

5. U dobivenoj datoteci peptidi su pravilno raspoređeni u ravnini kao na **sl. 69** i takvi su korišteni u simulacijama AA-12a. U simulacijama AA-12b peptidi su pojedinačno zakrenuti u raznim smjerovima.



Slika 70 Inicijalni raspored adepantina-1 u simulacijama AA-12b

Ovaj raspored je dobiven tako da je datoteka `adepantin1_12kom.gro` otvorena u VMD-u te su peptidi manualno translaterani pomoću miša („Mouse – Move – Fragment“) ili rotirani (pritisnuti Shift tipku i pomicati mišem, ili Shift-Alt istovremeno za više mogućnosti rotiranja). Izmijenjena struktura je sačuvana kao `12kom_random0.pdb`.

6. U dobivenoj datoteci svi peptidi imaju istu chain oznaku. Možemo ju promijeniti na analogan način kao u točki 4 pomoću skripte u kojoj samo treba izmijeniti naziv datoteke. Konačna datoteka je `12kom_random12.pdb`.
7. Tu datoteku unosimo u Charmm-gui i postupak je analogan onom u odjeljku **I** ovog poglavlja.

III. Kreiranje početnih struktura u CG simulacijama

- Struktura je kreirana pomoću CHARMM-GUI *Martini Bilayer Makera* [121], [122] (https://www.charmm-gui.org/?doc=input/martini.bilayer_pristup_u_lipnju_2022.). Iskoristena je već napravljena datoteka `12kom_random12.pdb` i Martini 2.2 polje sile [92].

Martini Bilayer Maker

PDB Info | STEP 1 | STEP 2 | STEP 3 | STEP 4 | STEP 5 | STEP 6

Title
PDB ID: 12KOM_ZACG_RANDOM12
Type: Protein
Experimental Method: Unknown

Model/Chain Selection Option:
Click on the chains you want to select.

Type	SEGID	PDB ID	Residue ID		Engineered Residues
			First	Last	
<input checked="" type="checkbox"/> Protein	PROA	A	1	24	NHE
<input checked="" type="checkbox"/> Protein	PROB	B	1	24	NHE
<input checked="" type="checkbox"/> Protein	PROC	C	1	24	NHE
<input checked="" type="checkbox"/> Protein	PROD	D	1	24	NHE
<input checked="" type="checkbox"/> Protein	PROE	E	1	24	NHE
<input checked="" type="checkbox"/> Protein	PROF	F	1	24	NHE
<input checked="" type="checkbox"/> Protein	PROG	G	1	24	NHE
<input checked="" type="checkbox"/> Protein	PROH	H	1	24	NHE
<input checked="" type="checkbox"/> Protein	PROI	I	1	24	NHE
<input checked="" type="checkbox"/> Protein	PROJ	J	1	24	NHE
<input checked="" type="checkbox"/> Protein	PROK	K	1	24	NHE
<input checked="" type="checkbox"/> Protein	PROL	L	1	24	NHE

Protein/Membrane System

Select Martini Models: `martini22`

Download PDB File: Download Source: `OPM`

Upload **All-atom** PDB File: `12kom_zac...ndom12.pdb`

PDB Format: PDB PDBx/mmCIF CHARMM

Check/Correct PDB Format

- Dodavanje terminusa na peptid. Želimo neutralni C-kraj i nabijeni N-kraj. *Martini Bilayer Maker* nema mogućnost izbora različito nabijenih završetaka pojedinačnog peptida, pa je to napravljeno manualno nakon završetka cijele procedure na CHARMM-GUI (vidi **korak 8.**) U tu svrhu, u ovom koraku, za jedan peptid je odabrano da oba završetka budu neutralna, a za ostale da oba završetka budu nabijena:

PDB Manipulation Options:

Renaming Engineered Residues:
Rename NHE to Leave blank to remove

Terminal charge:

PROA Charged Neutral
 PROB Charged Neutral
 PROC Charged Neutral
 PROD Charged Neutral
 PROE Charged Neutral
 PROF Charged Neutral
 PROG Charged Neutral
 PROH Charged Neutral
 PROI Charged Neutral
 PROJ Charged Neutral
 PROK Charged Neutral
 PROL Charged Neutral

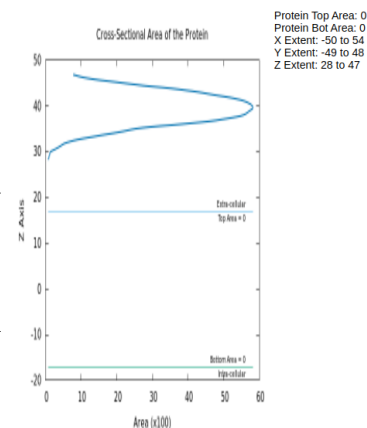
3. Orijentacija i položaj peptida. Pošto smo peptide već orijentirali kako želimo, koristit ćemo „Use PDB orientation“. Želimo ih translirati po z-osi, tako da se nakon dodavanja membrane nalaze iznad nje ~2 nm

Orientation Options:

- Use PDB Orientation This option is suggested for an oriented structure from <http://opm.phar.umich.edu>
- Align the First Principal Axis Along Z This option is suggested for small helical bundle or homo-oligomer.
- Align a Vector (Two Atoms) Along Z This option is suggested for an irregular, hetero-oligomer.
- Run PPM 2.0 This option run executable for given input structure at https://opm.phar.umich.edu/ppm_server2_cgopm It may take some minutes depending on protein size.

Positioning Options:

- Rotate Molecule respect to the X axis Degree
- Rotate Molecule respect to the Y axis Degree
- Translate Molecule along Z axis Angstrom
- Flip Molecule along the Z axis

Calculated Cross Sectional Area:

4. Količina vode određuje veličinu simulacijske kutije. Treba staviti dovoljno vode kako bi se smanjili periodički efekti. Ovdje ne moramo toliko paziti na veličinu sloja vode, odnosno na broj molekula vode kao u slučaju AA simulacija, jer u CG simulacijama je broj molekula mnogo manji i debljina od nekoliko desetaka angstrema neće znatnije utjecati na produljenje računalnog vremena simulacije.

1. Box Type:
 2. Length of Z based on:
 - Water thickness (Minimum water height on top and bottom of the system)
 3. Length of XY based on:
 - Ratios of lipid components
 - Numbers of lipid components
- XY Dimension Ratio:
(The system size along the X and Y must be the same)

5. Dodavanje lipida

POPE	0	16:0-18:0 / 16:1-18:1	[Image]	<input type="text" value="192"/>	<input type="text" value="192"/>	<input type="text" value="58.8"/>
POPG	-1	16:0-18:0 / 16:1-18:1	[Image]	<input type="text" value="64"/>	<input type="text" value="64"/>	<input type="text" value="62.0"/>

6. Dodavanje iona

System Building Options:

- Insertion method Build system using insertion method
- Replacement method Build system using replacement method
- Check lipid ring (and protein surface) penetration

For this system, insertion method can not be used. Replacement method will be used instead.

Component Building Options:

- Include Ions
 - M (ion concentration)
 - Add neutralizing ions 268 positive ions and 188 negative ions will be generated. Note that this is the estimated ion numbers, so the actual ion numbers may differ.
- Ion Placing Method: If your system does not contain nucleic acids, you can use "Distance" for faster ion placement.

7. Odabir ansambla i temperature

Equilibration Input Generation Options: NPT EnsembleDynamics Input Generation Options: NPT EnsembleTemperature: K

8. Nakon završetka preuzmemo datoteke na lokalno računalo na kojem ćemo manualno izmijeniti čestice na krajevima peptida. Svaki peptid ima svoju .itp datoteku. Kod prvog peptida su čestice na oba kraja neutralne, a kod ostalih su obje nabijene (vidi **korak 2.**), to znači da u prvom peptidu treba u odgovarajućoj .itp datoteci promijeniti tip prve čestice, a u ostalima tip zadnje.

PROA_P.itp (neutralni peptid):

```
[ atoms ]
  1  P5  1  GLY  BB  1  0.0000 ; C (promijeniti)
  2  Nd  2  ILE  BB  2  0.0000 ; 1
  3  AC1 2  ILE  SC1 3  0.0000 ; 1
  4  Nd  3  GLY  BB  4  0.0000 ; 1
  . . .
 42  Na 22  GLU  BB 42  0.0000 ; 2
 43  Qa 22  GLU  SC1 43 -1.0000 ; 2
 44  P5 23  SER  BB 44  0.0000 ; C
 45  P1 23  SER  SC1 45  0.0000 ; C
```

PROB_P.itp (nabijeni peptid):

```
[ atoms ]
  1  Qd  1  GLY  BB  1  1.0000 ; C
  2  Nd  2  ILE  BB  2  0.0000 ; 1
  3  AC1 2  ILE  SC1 3  0.0000 ; 1
  . . .
 42  Na 22  GLU  BB 42  0.0000 ; 2
 43  Qa 22  GLU  SC1 43 -1.0000 ; 2
 44  Qa 23  SER  BB 44 -1.0000 ; C (promijeniti)
 45  P1 23  SER  SC1 45  0.0000 ; C
```

Nakon izmjene, .itp datoteke ova dva peptida izgledaju ovako:

PROA_P.itp (neutralni peptid):

```
[ atoms ]
  1  Qd  1  GLY  BB  1  1.0000 ; C (promijenjeno)
  2  Nd  2  ILE  BB  2  0.0000 ; 1
  3  AC1 2  ILE  SC1 3  0.0000 ; 1
  4  Nd  3  GLY  BB  4  0.0000 ; 1
  . . .
 42  Na 22  GLU  BB 42  0.0000 ; 2
 43  Qa 22  GLU  SC1 43 -1.0000 ; 2
 44  P5 23  SER  BB 44  0.0000 ; C
 45  P1 23  SER  SC1 45  0.0000 ; C
```

PROB_P.itp (nabijeni peptid):

```
[ atoms ]
  1  Qd  1  GLY  BB  1  1.0000 ; C
  2  Nd  2  ILE  BB  2  0.0000 ; 1
```

```

3 AC1 2 ILE SC1 3 0.0000 ; 1
. . .
42 Na 22 GLU BB 42 0.0000 ; 2
43 Qa 22 GLU SC1 43 -1.0000 ; 2
44 P5 23 SER BB 44 0.0000 ; C (promijenjeno)
45 P1 23 SER SC1 45 0.0000 ; C

```

U .itp datotekama ostalih peptida treba napraviti izmjenu kao u drugom peptidu.

9. Pošto smo u prethodnom koraku izmijenili ukupan naboj sustava, da bi ostao neutralan potrebno je iz `step5_charmm2gmx.pdb` datoteke slučajnim odabirom ukloniti 12 Na⁺ iona i promijeniti njihov ukupan broj u .top datoteci.
10. Isto tako potrebno je i prilagoditi `index.ndx` datoteku, kreirajući novu i dodati u nju grupe: protein, membrane, solute (nazivi grupa koje se pojavljuju u .mdp datotekama minimizacije i ekvibracije)

```

gmx make_ndx -f step5_charmm2gmx.pdb -o index.ndx
name 1 protein
13|14 (jer su brojevi grupa POPE i POPG 13 i 14)
name 24 membrane (jer je broj kreirane grupe POPE_POPG 24)
15|16|17 (jer su brojevi grupa W, NA i CL 15, 16 i 17)
name 25 solute (jer je broj kreirane grupe W_NA_CL 25)
q

```

11. Minimizacija, ekvibracija i produkcija su analogne onima u AA simulacijama (odjeljak I u ovom poglavlju)

IV. Kreiranje početnih struktura u CG2AA simulacijama

Postupak transformacije CG u AA napravljen je pomoću CHARMM-GUI *Martini to All-atom Converter-a* [118]

1. Konačna konfiguracija sustava iz CG simulacije je u datoteci `confout.part0010.gro`, treba ga pripremiti za konverter:

```
gmx trjconv -f confout.part0010.gro -s md10.tpr -n index.ndx -o confout.part0010_nopbc_whole.pdb -pbc whole
```

```
gmx trjconv -f confout.part0010_nopbc_whole.pdb -s md10.tpr -n index.ndx -o confout.part0010_nopbc_whole_mol.pdb -pbc mol
```

2. Na web stranici <https://www.charmm-gui.org/?doc=input/converter.martini2all> unijeti `confout.part0010_nopbc_whole_mol.pdb` datoteku

System Type:

Upload PDB File: `confout.part...ole_mol.pdb`

PDB Format: GROMACS

3. Uvjerimo se da je aplikacija prepoznala sve peptide, lipide, molekule vode i iona.

Martini to All-atom Converter

PDB Info	STEP 1	STEP 2	STEP 3	STEP 4	STEP 5																																																				
<table border="1"> <tr> <td>Title</td> <td colspan="5">Martini system</td> </tr> <tr> <td>PDB ID</td> <td colspan="5">CONFOUT_PART0010_NOPBC_WHOLE_MOL</td> </tr> <tr> <td>Type</td> <td colspan="5">Protein + Membrane Complex</td> </tr> <tr> <td>Experimental Method</td> <td colspan="5">Unknown</td> </tr> </table>						Title	Martini system					PDB ID	CONFOUT_PART0010_NOPBC_WHOLE_MOL					Type	Protein + Membrane Complex					Experimental Method	Unknown																																
Title	Martini system																																																								
PDB ID	CONFOUT_PART0010_NOPBC_WHOLE_MOL																																																								
Type	Protein + Membrane Complex																																																								
Experimental Method	Unknown																																																								
<p>Recognized Martini Components:</p> <p>Membranes:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>SEGID</th> <th>Martini Residue</th> <th># of lipids</th> <th>CHARMM Residue</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input type="text" value="MEMA"/></td> <td>POPE</td> <td>384</td> <td><input type="text" value="POPE"/></td> </tr> <tr> <td></td> <td>POPG</td> <td>128</td> <td><input type="text" value="POPG"/></td> </tr> </tbody> </table> <p>Water:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>SEGID</th> <th>Martini Residue</th> <th># of water</th> <th>CHARMM Residue</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input type="text" value="WATA"/></td> <td>W</td> <td>16855</td> <td>TIP3</td> </tr> </tbody> </table> <p>Ions:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>SEGID</th> <th>Martini Atom Type</th> <th># of ions</th> <th>CHARMM Residue</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input type="text" value="IONA"/></td> <td>NA</td> <td>257</td> <td><input type="text" value="SOD"/></td> </tr> <tr> <td></td> <td>CL</td> <td>189</td> <td><input type="text" value="CLA"/></td> </tr> </tbody> </table>						SEGID	Martini Residue	# of lipids	CHARMM Residue	<input type="text" value="MEMA"/>	POPE	384	<input type="text" value="POPE"/>		POPG	128	<input type="text" value="POPG"/>	SEGID	Martini Residue	# of water	CHARMM Residue	<input type="text" value="WATA"/>	W	16855	TIP3	SEGID	Martini Atom Type	# of ions	CHARMM Residue	<input type="text" value="IONA"/>	NA	257	<input type="text" value="SOD"/>		CL	189	<input type="text" value="CLA"/>																				
SEGID	Martini Residue	# of lipids	CHARMM Residue																																																						
<input type="text" value="MEMA"/>	POPE	384	<input type="text" value="POPE"/>																																																						
	POPG	128	<input type="text" value="POPG"/>																																																						
SEGID	Martini Residue	# of water	CHARMM Residue																																																						
<input type="text" value="WATA"/>	W	16855	TIP3																																																						
SEGID	Martini Atom Type	# of ions	CHARMM Residue																																																						
<input type="text" value="IONA"/>	NA	257	<input type="text" value="SOD"/>																																																						
	CL	189	<input type="text" value="CLA"/>																																																						
<p>Proteins / DNA:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>SEGID</th> <th>PDB ID</th> <th>Residue ID</th> <th>Engineered Residues</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td><input type="text" value="PROA"/></td><td>A</td><td>1-23</td><td>None</td></tr> <tr><td><input type="text" value="PROB"/></td><td>B</td><td>1-23</td><td>None</td></tr> <tr><td><input type="text" value="PROC"/></td><td>C</td><td>1-23</td><td>None</td></tr> <tr><td><input type="text" value="PROD"/></td><td>D</td><td>1-23</td><td>None</td></tr> <tr><td><input type="text" value="PROE"/></td><td>E</td><td>1-23</td><td>None</td></tr> <tr><td><input type="text" value="PROF"/></td><td>F</td><td>1-23</td><td>None</td></tr> <tr><td><input type="text" value="PROG"/></td><td>G</td><td>1-23</td><td>None</td></tr> <tr><td><input type="text" value="PROH"/></td><td>H</td><td>1-23</td><td>None</td></tr> <tr><td><input type="text" value="PROI"/></td><td>I</td><td>1-23</td><td>None</td></tr> <tr><td><input type="text" value="PROJ"/></td><td>J</td><td>1-23</td><td>None</td></tr> <tr><td><input type="text" value="PROK"/></td><td>K</td><td>1-23</td><td>None</td></tr> <tr><td><input type="text" value="PROL"/></td><td>L</td><td>1-23</td><td>None</td></tr> </tbody> </table>						SEGID	PDB ID	Residue ID	Engineered Residues	<input type="text" value="PROA"/>	A	1-23	None	<input type="text" value="PROB"/>	B	1-23	None	<input type="text" value="PROC"/>	C	1-23	None	<input type="text" value="PROD"/>	D	1-23	None	<input type="text" value="PROE"/>	E	1-23	None	<input type="text" value="PROF"/>	F	1-23	None	<input type="text" value="PROG"/>	G	1-23	None	<input type="text" value="PROH"/>	H	1-23	None	<input type="text" value="PROI"/>	I	1-23	None	<input type="text" value="PROJ"/>	J	1-23	None	<input type="text" value="PROK"/>	K	1-23	None	<input type="text" value="PROL"/>	L	1-23	None
SEGID	PDB ID	Residue ID	Engineered Residues																																																						
<input type="text" value="PROA"/>	A	1-23	None																																																						
<input type="text" value="PROB"/>	B	1-23	None																																																						
<input type="text" value="PROC"/>	C	1-23	None																																																						
<input type="text" value="PROD"/>	D	1-23	None																																																						
<input type="text" value="PROE"/>	E	1-23	None																																																						
<input type="text" value="PROF"/>	F	1-23	None																																																						
<input type="text" value="PROG"/>	G	1-23	None																																																						
<input type="text" value="PROH"/>	H	1-23	None																																																						
<input type="text" value="PROI"/>	I	1-23	None																																																						
<input type="text" value="PROJ"/>	J	1-23	None																																																						
<input type="text" value="PROK"/>	K	1-23	None																																																						
<input type="text" value="PROL"/>	L	1-23	None																																																						

4. Ostali koraci na CHARMM-GUI poslužitelju su analogni onima u odjeljku I ovog poglavlja. Konačne datoteke prenijeti na lokalno računalo.
5. Minimizacija sa generiranom `step6.0_minimization.mdp` datotekom ni nakon više pokušaja nije prošla uspješno. Čak ni nakon nekoliko puta ponovljene cijele procedure na web stranici. Problem je riješen na način kako slijedi.

Konverzija iz CG u AA se može napraviti neovisno o CHARMM-GUI *Martini to All-atom converter-u*, pomoću *backward* algoritma [119]. Pošto već imamo konvertiranu strukturu, preuzeta je procedura minimizacije iz skripte `initram-v5.sh` (<http://www.cgmartini.nl/images/tools/backward/initram-v5.sh>). Za minimizaciju su iskorištene sljedeće dvije `.mdp` datoteke:

1-EM.mdp:

```
define=-DFLEXIBLE
integrator=steep
nsteps=500
emstep=0.1
pbc=xyz

; Table extension is needed initially
table-extension=2

; During first steps nonbonded interactions
; are excluded within groups membrane and protein
energygrps=SOLU MEMB SOLV
energygrp_excl=SOLU SOLU MEMB MEMB

; for gmx5, need cutoff-scheme = Group to allow energy group exclusions
cutoff-scheme = Group

; Usually no trajectory is written,
; but this can be changed (-trj)
nstxout=0
```

2-EM.mdp:

```
define=-DFLEXIBLE
integrator=steep
nsteps=500
emstep=0.1
pbc=xyz

; Table extension is needed initially
;table-extension=2

; During first steps nonbonded interactions
; are excluded within groups membrane and protein
energygrps=SOLU MEMB SOLV
;energygrp_excl=SOLU SOLU MEMB MEMB

; for gmx5, need cutoff-scheme = Group to allow energy group exclusions
cutoff-scheme = Group

; Usually no trajectory is written,
; but this can be changed (-trj)
nstxout=0
```

U njima se koristi `cutoff-scheme = Group` koja se prestala koristiti u verzijama Gromacsa većim od 5.0 (naša verzija je Gromacs 2021.3). U tu svrhu bilo je potrebno instalirati Gromacs verziju 5 i napraviti minimizaciju.

```
source /usr/local/gromacs5/bin/GMXRC
```

```
gmx grompp -f 1-EM.mdp -c step5_input.gro -n index.ndx -p topol.top -o 1-EM.tpr
gmx mdrun -v -deffnm 1-EM
```



```
gmx grompp -f 2-EM.mdp -c 1-EM.gro -n index.ndx -p topol.top -o 2-EM.tpr
gmx mdrun -v -deffnm 2-EM
```

Nakon obje minimizacije u našem slučaju dolazila je obavijest kako je procedura konvergirala u okviru preciznosti računala, ali maksimalna sila (Fmax) na atome nije manja od željene (reda je veličine 10^4 , a treba biti manja od 10^3). Stoga smo nastavili s minimizacijom, ali sa `step6.0_minimization.mdp` datotekom koju je generirao CHARMM-GUI, sa Gromacsom 2021.3. Prethodno je u `.mdp` datoteci povećan broj koraka na 15000 jer nije dovoljan zadani broj 5000.

```
gmx grompp -f step6.0_minimization.mdp -o step6.0_minimization.tpr -c 2-EM.gro -
r 2-EM.gro -p topol.top -n index.ndx

gmx mdrun -v -deffnm step6.0_minimization
```

Na ovaj način minimizacija je uspješno napravljena.

6. Ekvilibracija i produkcija je analogna onoj iz odjeljka I ovog poglavlja.

V. Kreiranje početnih struktura u simulacijama vanjske membrane Gram-negativnih bakterija

Sustavi koji uključuju vanjske membrane Gram-negativnih bakterija kreirani su u CHARMM-GUI *Bilayer Builderu* <https://www.charmm-gui.org/?doc=input/membrane.bilayer>

1. Strukturna .pdb datoteka jednog ili više adeptina iskorištena je iz prethodnih simulacija, a prvi koraci su analogni proceduri opisanoj u odjeljku I ovog poglavlja. U koraku gdje se traži pozicioniranje peptida treba odabrati translaciju peptida za oko 100 Å kako bi peptidi bili inicijalno iznad membrane, jer je debljina vanjske membrane veća od debljine unutarnje.

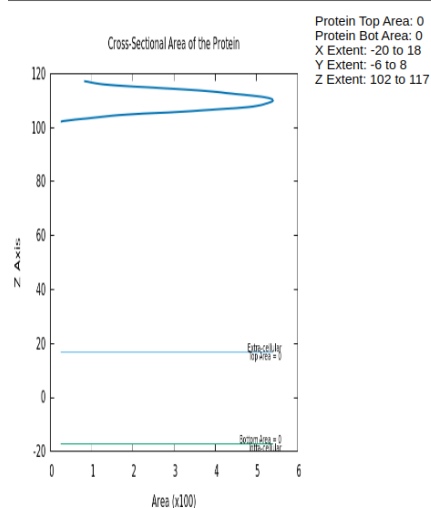
Orientation Options: 7

- Use PDB Orientation This option is suggested for an oriented structure from <http://opm.phar.umich.edu>
- Align the First Principal Axis Along Z This option is suggested for small helical bundle or homo-oligomer.
- Align a Vector (Two Atoms) Along Z This option is suggested for an irregular, hetero-oligomer.
- Run PPM 2.0 This option run executable for given input structure at https://opm.phar.umich.edu/ppm_server2_cgopm It may take some minutes depending on protein size.

Positioning Options:

- Rotate Molecule respect to the X axis Degree
- Rotate Molecule respect to the Y axis Degree
- Translate Molecule along Z axis Angstrom
- Flip Molecule along the Z axis

Calculated Cross Sectional Area:



2. Izaberi dovoljno velik stupac vode

1. Box Type: (Currently, only CHARMM, NAMD, and GROMACS support)

2. Length of Z based on:

- Water thickness (Minimum water height on top and bottom of the system)
- Hydration number (Number of water molecules per one lipid molecule)

3. Length of XY based on:

- Ratios of lipid components
- Numbers of lipid components

XY Dimension Ratio:

(The system size along the X and Y must be the same)

3. Odabir lipida

Donji sloj:

PVPE	0	16:0 / 18:1	[Image]	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="105"/>	<input type="text" value="63.0"/>
PVPG	-1	16:0 / 18:1	[Image]	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="30"/>	<input type="text" value="62.0"/>
PVCL2	-2	16:0,16:0 / 18:1,18:1	[Image]	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="8"/>	<input type="text" value="130.0"/>

Gornji sloj:

LPS Sequence:

Species:

Lipid A: [\[image\]](#) Phosphate Charge: Phos.A: Phos.B:

Core:
 --7)aLDHep(1--6)aDGlc(1--2)aDGlc(1--3)aDGal(1--6)aDGlc(1--3)aLDHep(1--7)aLDHep(1--3)aLDHep(1--5)
[aDKdo(2--4)aDKdo(2--

O-units:

O-antigen: --4)aDGalNAc(1--3)[bDGlc(1--2)]bDMan(1--4)bDMan(1--3)aDGlcNAc(1--

available O-antigens
O1 O2 O3 O4 O5 O6 O7 O8 O9 O10 O11 O12 O13 O15 O16 O17 O18 O19 O20 O21
O22 O23 O24 O25 O26 O27 O28 O29 O30 O32 O33 O35 O36 O37 O38 O39 O40 O41 O42 O43
O44 O45 O46 O48 O49 O50 O51 O52 O53 O54 O55 O56 O57 O58 O59 O60 O61 O62 O64 O65
O66 O68 O69 O70 O71 O73 O74 O75 O76 O77 O78 O79 O80 O81 O82 O83 O84 O85 O86 O87
O88 O90 O91 O92 O95 O96 O97 O98 O99 O100 O101 O102 O103 O104 O105 O106 O107 O108 O109 O110
O111 O112 O113 O114 O115 O116 O117 O118 O119 O120 O121 O123 O124 O125 O126 O127 O128 O129 O130 O131
O132 O133 O136 O137 O138 O139 O140 O141 O142 O143 O145 O146 O147 O148 O149 O150 O151 O152 O153
O154 O155 O156 O157 O158 O159 O160 O161 O162 O163 O164 O165 O166 O167 O168 O169 O170 O171 O172 O173
O174 O175 O176 O177 O178 O179 O180 O181 O182 O183 O184 O185 O186 O187 O188

Core Sequence:

Chemical modification:

Residue	Residue ID	Site	Modification
LPS	LD-mannoheptose	3	4 Phosphorylation (-2)
LPS	LD-mannoheptose	4	4 Phosphorylation (-2)

Core - O-antigen Linkage:

core resid

O-antigen Sequence:

o-antigen resid -10 ECLIPA ECK12O6[2]

Napomena: U trenutnoj verziji LPS buildera pristan je mali bug. Naime, nakon dodavanja lipida potrebno je kliknuti na „show info“. No, nakon klika, automatski se označi opcija „Turn on protein projection onto XY of upper leaflet“.

Protein Projection onto XY:

Projection of protein portions above and below the membrane surface

- Turn on protein projection onto XY of upper leaflet
 Turn on protein projection onto XY of lower leaflet
This option is not recommended to use unless it is absolutely necessary

Potrebno ju je deselektirati, inače program neće umetnuti lipide u gornjem sloju koji su ispod peptida, i u gornjem sloju se pojavljuje praznina između LPS molekula

Protein Projection onto XY:

Projection of protein portions above and below the membrane surface

- Turn on protein projection onto XY of upper leaflet
 Turn on protein projection onto XY of lower leaflet
This option is not recommended to use unless it is absolutely necessary

4. Ostali koraci na CHARMM-GUI poslužitelju, te minimizacija, ekvibracija i produkcija analogni su onima opisanim u odjeljku I ovog poglavlja.

9.1.2 Kiadini

I. Kreiranje anionske POPE:POPG membrane

1. Strukturne (`md-POPE_200ns.gro`, `md-POPG_200ns.gro`) i topološke (`POPE_GROMOS-CKP.itp`, `POPG-D_GROMOS-CKP.itp`, `POPG-L_GROMOS-CKP.itp`) [132], [43], [131]) datoteke POPE i POPG lipida preuzete su sa web poslužitelja www.lipidbook.org (pristup u Ožujku 2020.). POPG lipidi se sastoje od dvije grupe POPG-D i POPG-L da bi imali sistem sa neutralnom kiralnosti [134].
2. Iz strukturnih datoteka, izdvojene su pojedinačne molekule POPE, POPG-D i POPG-L, svaka u posebnu `.gro` datoteku koje su onda pomoću gromacsovog `editconf` programa prebačene u `.pdb` format.
3. Dobivene `.pdb` datoteke su ubačene u mrežni poslužitelj “Membrane generator” <http://memgen.uni-goettingen.de/> [96] u omjeru POPE:POPG 3:1, sa APL od 61.5 [100] i 40 molekula vode po lipidu. Rezultat je membrana u vodenom okolišu sa ukupno 256 lipida (96 POPE, 16 POPG-D i 16 POPG-L lipida u svakom od dva membranska sloja)

4. Sistem je neutraliziran dodavanjem 64 Na^+ iona:

```
gmx grompp -f ions.mdp -c membrana_pope_pogp_L_D_voda.gro -p topol.top -o ions.tpr -maxwarn 2
```

```
gmx genion -s ions.tpr -o membrana_pope_pogp_L_D_voda_ions.gro -p topol.top -pname NA -nname CL -neutral
```

5. Minimizacija:

```
em.mdp:
integrator           = steep
nsteps = 2000
emstep = 0.01
emtol = 1000.0
nstcgsteep = 10
comm-mode           = Linear
nstcomm             = 1
comm-grps           =
nstlist             = 10
ns_type             = grid
pbc                 = xyz
```

```

rlist                = 1.2
coulombtype          = PME
rcoulomb-switch      = 0
rcoulomb             = 1.2
epsilon_r            = 1
epsilon_rf           = 1
vdw-type             = Cut-off
rvdw-switch          = 0
rvdw                 = 1.2
DispCorr             = EnerPres
fourierspacing       = 0.18
fourier_nx           = 0
fourier_ny           = 0
fourier_nz           = 0
pme_order            = 5
ewald_rtol           = 1e-05
ewald_geometry       = 3d
epsilon_surface      = 0
optimize_fft         = yes
constraints           = none

```

```

gmx grompp -f em.mdp -c membrana_pope_popg_L_D_voda_ions.gro -p topol.top -o
em.tpr -maxwarn 1

```

```

gmx mdrun -v -deffnm em

```

6. Kreiranje index.ndx datoteke i grupe koja uključuje sve lipide koji čine membranu (POPE_LPOG_DPOG):

```

gmx make_ndx -f em.gro -o index.ndx
;odabrati brojeve grupa POPE (2), LPOG (3) i DPOG (4)
2|3|4
q

```

7. Ekvilibracija u izotermno-izobarnim NpT uvjetima obavljena je na superračunalu „Bura“ (<https://cnrm.uniri.hr/hr/bura/>) na koju su prebačene sve datoteke. Tijekom ekvilibracije korišten je postupak postupnog zagrijavanja (engl. *temperature annealing*) od 50 K do 310 K tijekom 150 ps uz *V-rescale* termostat i *Berendsen* barostat s konstantama 0.1 and 1.0 respektivno.

nvt_npt.mdp:

```

; VARIOUS PREPROCESSING OPTIONS
title                = 150-ps warm-up of popepopg
define                = -DPOSRES

; RUN CONTROL PARAMETERS
integrator            = md
; Start time and timestep in ps
tinit                = 0
dt                    = 0.002
nsteps                = 90000
; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step            = 0
; mode for center of mass motion removal
comm-mode            = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcomm              = 1
; group(s) for center of mass motion removal
comm-grps            = POPE_LPOG_DPOG Water_and_ions

; OUTPUT CONTROL OPTIONS
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f)

```

```

nstxout          = 50000
nstvout          = 50000
nstfout         = 0
; Checkpointing helps you continue after crashes
nstcheckpoint   = 500
; Output frequency for energies to log file and energy file
nstlog          = 1000
nstenergy       = 1000
; Output frequency and precision for xtc file
nstxtcout      = 500
xtc-precision   = 1000
; Selection of energy groups
energygrps     = POPE_LPOG_DPOG SOL NA

; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS
; nblast update frequency
nblast         = 2
; ns algorithm (simple or grid)
ns-type        = Grid
; Periodic boundary conditions: xyz (default), no (vacuum)
; or full (infinite systems only)
pbc            = xyz
; nblast cut-off
rblast         = 0.8
domain-decomposition = no

; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW
; Method for doing electrostatics
coulombtype    = Reaction-Field
rcoulomb-switch = 0
rcoulomb       = 1.2
; Relative dielectric constant for the medium and the reaction field
epsilon-r      = 1
;epsilon_rf    = 62
; Method for doing Van der Waals
vdw-type       = Cut-off
; cut-off lengths
rvdw-switch   = 0
rvdw          = 1.2
; Extension of the potential lookup tables beyond the cut-off
table-extension = 1.0

; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
tcoupl        = V-rescale
; Groups to couple separately
tc-grps       = POPE_LPOG_DPOG Water_and_ions
; Time constant (ps) and reference temperature (K)
tau-t         = 0.1 0.1
ref-t         = 310 310
; Pressure coupling
Pcoupl        = Berendsen
Pcoupltype    = isotropic
; Time constant (ps), compressibility (1/bar) and reference P (bar)
tau-p         = 1.0
compressibility = 4.5e-5
ref-p         = 1.0
refcoord_scaling = com

; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen-vel       = yes
gen-temp      = 50
gen-seed      = 3141592

; SIMULATED ANNEALING
; Type of annealing for each temperature group (no/single/periodic)
annealing     = single single
; Number of time points to use for specifying annealing in each group
annealing_npoints = 11 11
; List of times at the annealing points for each group
annealing_time = 0 10 30 40 60 70 90 100 120 130 150 0 10 30 40
60 70 90 100 120 130 150
; Temp. at each annealing point, for each group.
annealing_temp = 50 100 100 150 150 200 200 250 250 300 310 50 100 100 150
150 200 200 250 250 300 310

```

```

; OPTIONS FOR BONDS
constraints          = all-bonds
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm = Lincs
; Do not constrain the start configuration
unconstrained-start = no

gmx_mpi grompp -f nvt_npt.mdp -c em.gro -p topol.top -n index.ndx -o nvt_npt.tpr
-r em.gro -maxwarn 1

nvt_npt.sh:
#!/bin/sh
#SBATCH --job-name=popepopg_l_d_256
#SBATCH --nodes=20
#SBATCH --ntasks=240
#SBATCH --cpus-per-task=1
#SBATCH --exclusive
#SBATCH --partition=computes_thin
#SBATCH --time=100:00:00

mpirun gmx_mpi mdrun -pin on -v -deffnm nvt_npt -dlb yes

sbatch nvt_npt.sh

```

8. Membrana je dodatno uravnotežena simulacijom u trajanju od 200 ns

```

mdp.mdp:
title          = popepopg-D-L-256 200ns
; Run parameters
integrator     = md          ; leap-frog integrator
nsteps        = 100000000    ; 2 * 100000000 = 200000 ps (200 ns)
dt            = 0.002        ; 2 fs
; Output control
nstxout       = 50000        ; save coordinates every 100 ps
nstvout       = 50000        ; save velocities every 100 ps
nstxtcout     = 20000        ; xtc compressed trajectory output every 40 ps
nstenergy     = 50000        ; save energies every 100 ps
nstlog        = 500000       ; update log file every 1000 ps
; Bond parameters
continuation   = yes         ; Restarting after NVT NPT
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints    = all-bonds   ; all bonds (even heavy atom-H bonds) constrained
lincs_iter    = 1           ; accuracy of LINCS
lincs_order   = 4           ; also related to accuracy
; Neighborsearching
ns_type        = grid        ; search neighboring grid cels
nstlist        = 5           ; 10 fs
rlist          = 1.0         ; short-range neighborlist cutoff (in nm)
rcoulomb       = 1.0         ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw           = 1.0         ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype    = PME         ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order      = 4           ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16       ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling is on
tcoupl         = Nose-Hoover ; More accurate thermostat
tc-grps        = POPE_LPOG_DPOG water_and_ions ;
tau_t          = 0.5 0.5     ; time constant, in ps
ref_t          = 310 310     ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling is on
pcoupl         = Parrinello-Rahman ; Pressure coupling on in NPT
pcoupltype     = semiisotropic ; uniform scaling of x-y box vectors, independent z
tau_p          = 2.0         ; time constant, in ps
ref_p          = 1.0 1.0     ; reference pressure, x-y, z (in bar)
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5 ; isothermal compressibility, bar^-1
; Periodic boundary conditions
pbc            = xyz         ; 3-D PBC
; Dispersion correction
DispCorr       = EnerPres   ; account for cut-off vdw scheme
; Velocity generation

```



```
gen_vel      = no          ; velocity generation is off
; COM motion removal
; These options remove motion of the protein/bilayer relative to the solvent/ions
nstcomm      = 1
comm-mode    = Linear
comm-grps    = POPE_LPOG_DPOG Water_and_ions

gmx_mpi grompp -f md.mdp -c nvt_npt.gro -t nvt_npt.cpt -p topol.top -n index.ndx
-o mdrun.tpr -maxwarn 1
```

mdrun.sh:

```
#!/bin/sh
#SBATCH --job-name=popepopg_1_d_256
#SBATCH --nodes=20
#SBATCH --ntasks=240
#SBATCH --cpus-per-task=1
#SBATCH --exclusive
#SBATCH --partition=computes_thin
#SBATCH --time=100:00:00
mpirun gmx_mpi mdrun -pin on -v -deffnm mdrun -dlb yes

sbatch mdrun.sh
```

II. Kreiranje neutralne DLPC membrane

1. Strukturna ([dlpc128_water.pdb](#)) i topološka ([dlpc.itp](#) sa dodatkom [lipids_vdw.itp](#)) datoteka DLPC lipida preuzete su sa web poslužitelja www.lipidbook.org (pristup u Ožujku 2020.).
2. Iz strukturne datoteke, izdvojena je jedna molekula DLPC u posebnu .pdb datoteku.
3. Dobivena .pdb datoteka je ubačena na mrežni poslužitelj “Membrane generator” <http://memgen.uni-goettingen.de/> [96] sa APL od $63.2 \pm 0.5 \text{ \AA}^2$ [166] i 50 molekula vode po lipidu. Rezultat je membrana u vodenom okolišu sa ukupno 256 lipida (128 lipida u svakom od slojeva).

4. Sistem je neutralan pa dodavanje iona nije potrebno. Minimizacija:

em.mdp:

```
; minim.mdp - used as input into grompp to generate em.tpr
; Parameters describing what to do, when to stop and what to save
;define = -DSTRONG_POSRES
integrator      = steep          ; Algorithm (steep = steepest descent minimization)
emtol          = 1000.0         ; Stop minimization when the maximum force < 1000.0 kJ/mol/nm
emstep         = 0.01           ; Energy step size
nsteps         = 50000          ; Maximum number of (minimization) steps to perform

; Parameters describing how to find the neighbors of each atom and how to calculate the
interactions
nstlist        = 1              ; Frequency to update the neighbor list and long range
forces
ns_type        = grid           ; Method to determine neighbor list (simple, grid)
rlist          = 1.2            ; Cut-off for making neighbor list (short range forces)
coulombtype    = PME            ; Treatment of long range electrostatic interactions
rcoulomb       = 1.2            ; Short-range electrostatic cut-off
rvdw           = 1.2            ; Short-range Van der Waals cut-off
pbc            = xyz            ; Periodic Boundary Conditions
```

```
gmx grompp -f em.mdp -c membrana_dlpc.gro -p topol.top -o em.tpr -maxwarn 1
```

```
gmx mdrun -v -deffnm em
```

5. Kreiranje `index.ndx` datoteke

```
gmx make_ndx -f em.gro -o index.ndx
q
```

6. Ekvilibracija u izotermno-izobarnim NpT uvjetima obavljena je na superračunalu „Bura“ (<https://cnrm.uniri.hr/hr/bura/>) na koju su prebačene sve datoteke. Tijekom ekvilibracije korišten je postupak postupnog zagrijavanja (engl. *temperature annealing*) od 50 K do 310 K tijekom 150 ps uz *V-rescale* termostat i *Berendsen* barostat s konstantama 0.1 and 1.0 respektivno.

`nvt_npt.mdp`:

```
; VARIOUS PREPROCESSING OPTIONS
title                = 150-ps warm-up of dlpc membrane
define               = -DPOSRES

; RUN CONTROL PARAMETERS
integrator           = md
; Start time and timestep in ps
tinit               = 0
dt                  = 0.002
nsteps              = 90000
; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step           = 0
; mode for center of mass motion removal
comm-mode           = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcomm             = 1
; group(s) for center of mass motion removal
comm-grps           = DLPC Water

; OUTPUT CONTROL OPTIONS
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f)
nstxout             = 50000
nstvout             = 50000
nstfout             = 0
; Checkpointing helps you continue after crashes
nstcheckpoint       = 500
; Output frequency for energies to log file and energy file
nstlog              = 1000
nstenergy           = 1000
; Output frequency and precision for xtc file
nstxtcout           = 500
xtc-precision       = 1000
; Selection of energy groups
energygrps          = DLPC SOL

; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS
; nblast update frequency
nstlist             = 2
; ns algorithm (simple or grid)
ns-type             = Grid
; Periodic boundary conditions: xyz (default), no (vacuum)
; or full (infinite systems only)
pbc                 = xyz
; nblast cut-off
rlist               = 0.8
domain-decomposition = no

; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW
; Method for doing electrostatics
coulombtype         = Reaction-Field
rcoulomb-switch     = 0
rcoulomb            = 1.2
; Relative dielectric constant for the medium and the reaction field
epsilon-r           = 1
```

```

;epsilon_rf           = 62
; Method for doing Van der Waals
vdw-type             = Cut-off
; cut-off lengths
rvdw-switch         = 0
rvdw                = 1.2
; Extension of the potential lookup tables beyond the cut-off
table-extension     = 1.0

; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
tcoupl              = v-rescale
; Groups to couple separately
tc-grps             = DLPC water
; Time constant (ps) and reference temperature (K)
tau-t               = 0.1 0.1
ref-t               = 310 310
; Pressure coupling
Pcoupl              = Berendsen
Pcoupltype          = isotropic
; Time constant (ps), compressibility (1/bar) and reference P (bar)
tau-p               = 1.0
compressibility     = 4.5e-5
ref-p               = 1.0
refcoord_scaling    = com

; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen-vel             = yes
gen-temp            = 50
gen-seed            = 3141592

; SIMULATED ANNEALING
; Type of annealing for each temperature group (no/single/periodic)
annealing           = single single
; Number of time points to use for specifying annealing in each group
annealing_npoints   = 11 11
; List of times at the annealing points for each group
annealing_time      = 0 10 30 40 60 70 90 100 120 130 150 0 10 30 40
60 70 90 100 120 130 150
; Temp. at each annealing point, for each group.
annealing_temp      = 50 100 100 150 150 200 200 250 250 300 310 50 100 100 150
150 200 200 250 250 300 310

; OPTIONS FOR BONDS
constraints          = all-bonds
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm = Lincs
; Do not constrain the start configuration
unconstrained-start = no

```

```

gmx_mpi grompp -f nvt_npt.mdp -c em.gro -p topol.top -n index.ndx -o nvt_npt.tpr
-r em.gro -maxwarn 1

```

nvt_npt.sh:

```

#!/bin/sh
#SBATCH --job-name=dlpc_256
#SBATCH --nodes=20
#SBATCH --ntasks=240
#SBATCH --cpus-per-task=1
#SBATCH --exclusive
#SBATCH --partition=computes_thin
#SBATCH --time=100:00:00

mpirun gmx_mpi mdrun -pin on -v -deffnm nvt_npt -dlb yes

sbatch nvt_npt.sh

```

7. Membrana je dodatno uravnotežena simulacijom od 100 ns

md.mdp:

```

title      = DLPC 256 100ns
; Run parameters
integrator = md          ; leap-frog integrator
nsteps     = 5000000     ; 2 * 5000000 = 10000 ps (100 ns)
dt         = 0.002      ; 2 fs
; Output control
nstxout    = 50000      ; save coordinates every 100 ps
nstvout    = 50000      ; save velocities every 100 ps
nstxtcout  = 20000      ; xtc compressed trajectory output every 40 ps
nstenergy  = 50000      ; save energies every 100 ps
nstlog     = 500000     ; update log file every 1000 ps
; Bond parameters
continuation = yes      ; Restarting after NVT NPT
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints  = all-bonds ; all bonds (even heavy atom-H bonds) constrained
lincs_iter  = 1         ; accuracy of LINCS
lincs_order = 4         ; also related to accuracy
; Neighborsearching
ns_type     = grid      ; search neighboring grid cells
nstlist     = 5         ; 10 fs
rlist       = 1.0       ; short-range neighborlist cutoff (in nm)
rcoulomb    = 1.0       ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw        = 1.0       ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype = PME       ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order   = 4         ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16 ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling is on
tcoupl      = Nose-Hoover ; More accurate thermostat
tc-grps     = DLPC Water ;
tau_t       = 0.5 0.5    ; time constant, in ps
ref_t       = 310 310    ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling is on
pcoupl      = Parrinello-Rahman ; Pressure coupling on in NPT
pcoupltype  = semiisotropic ; uniform scaling of x-y box vectors, independent z
tau_p       = 2.0       ; time constant, in ps
ref_p       = 1.0 1.0    ; reference pressure, x-y, z (in bar)
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5 ; isothermal compressibility, bar^-1
; Periodic boundary conditions
pbc         = xyz       ; 3-D PBC
; Dispersion correction
DispCorr    = EnerPres ; account for cut-off vdw scheme
; Velocity generation
gen_vel     = no        ; Velocity generation is off
; COM motion removal
; These options remove motion of the protein/bilayer relative to the solvent/ions
nstcomm     = 1
comm-mode   = Linear
comm-grps   = DLPC Water

```

```

gmx_mpi grompp -f md.mdp -c nvt_npt.gro -t nvt_npt.cpt -p topol.top -n index.ndx
-o md0.tpr -maxwarn 1

```

mdrun.sh:

```

#!/bin/sh
#SBATCH --job-name=dLpc_256
#SBATCH --nodes=20
#SBATCH --ntasks=240
#SBATCH --cpus-per-task=1
#SBATCH --exclusive

```

```
#SBATCH --partition=computes_thin
#SBATCH --time=100:00:00

mpirun gmx_mpi mdrun -pin on -v -deffnm mdrun -dlb yes

sbatch mdrun.sh
```

III. Kreiranje sistema anionska membrana + peptid ili neutralna membrana + peptid

1. Iz prethodnih simulacija sa čistim membranama dobivene su trajektorije (mdrun.xtc) i konačne strukture (mdrun.gro) koje uključuju membranu, vodu (i ione, u slučaju anionske membrane). Iz tih konačnih strukturnih datoteka su ručno izbrisani retci koji se odnose na vodu (i ione), te je izračunat broj preostalih atoma i unesen na vrh .gro datoteke. Dobivena datoteka koja sadrži samo ekvilibriranu membranu je nazvana `membrana_bezvode.gro`.
2. Pošto se u ovim simulacijama nalazi peptid iznad membrane, treba povećati z-koordinatu simulacijske kutije kako bi se smanjili periodički efekti na peptid:

```
gmx editconf -f membrana_bezvode.gro -o membrana_bezvode_centrirana_povecanz.gro
-c -box 8.92454 8.92454 13
```

3. Startne .gro strukture kiadina su dobivene pomoću QUARK poslužitelja (<https://zhanggroup.org/QUARK/> pristup u Ožujku 2020. [94]).
4. Poravnavanje peptida paralelno x-y ravnini:

```
gmx editconf -f kiadin.gro -o kiadin_princ.pdb -princ
```

(poravnava peptid tako da mu se os uzvojnice podudara sa „principal axis“ sistema, a to je za nove verzije gromacsa x-os)

5. Imamo dvije vrste simulacija: peptid s polarnom stranom okrenutom prema dolje (case1) i peptid s polarnom stranom okrenutom prema gore (case2). Prethodno poravnati peptid treba stoga zarotirati. Vizualizacijom u vmd-u i primjenom sljedeće naredbe eventualno više puta postići željeno stanje:

```
gmx editconf -f kiadin_princ.pdb -o kiadin_princ_rotiran_polarnigore.pdb -rotate
-35 0 0
```

(rotira peptid oko x osi u smjeru suprotnom od kazaljke na satu, ako gledamo x - os od pozitivnog ka negativnom kraju)

6. Promijeniti dimenzije simulacijske kutije od kiadina da budu iste onima od `membrana_bezvode.gro` i centrirati peptid u njoj:

```
gmx editconf -f kiadin_princ_rotiran_polarnidolje.pdb -o
kiadin_princ_rotiran_polarnidolje_newbox.gro -c -box 8.92454 8.92454 13
```

7. Pomoću vmd-a ili na neki drugi način odrediti prosječnu visinu P atoma iz gornjeg sloja membrane. Translatirati peptid duž z-osi, takoda mu z-koordinata osi uzvojnice bude ~2 nm iznad P-atoma, odnosno iznad membrane:


```
gmx editconf -f kiadin_princ_rotiran_polarnidolje_newbox.gro -o
kiadin_princ_rotiran_polarnidolje_newbox_newz.gro -box 8.92454 8.92454 13 -center
4.462 4.462 11
```

8. Imamo dvije datoteke: `membrana_bezvode_centrirana_povecanz.gro` i `kiadin_princ_rotiran_polarnidolje_newbox_newz.gro` sa istom veličinom simulacijske kutije. Spojimo ih u jednu datoteku `system.gro`

```
cat kiadin_princ_rotiran_polarnidolje_newbox_newz.gro
membrana_bezvode_centrirana_povecanz.gro > system.gro
```

Dobili smo strukturnu datoteku membrane i kiadina iznad nje. Izračunati konačan broj atoma i promijeniti ga pri vrhu dobivene `system.gro` datoteke. Izbrisati suvišne retke (dimenzije kiadina, broj atoma, header i broj atoma iz membranske datoteke) kako ne bi dobili grešku pri daljnjim koracima.

9. Dodavanje vode u sustav

```
gmx solvate -cp system.gro -cs spc216.gro -o system_solv.gro -p topol.top
```

10. Molekule vode se nakon prethodne naredbe nalaze i u središnjem hidrofobnom dijelu membrane gdje ne bi smjele biti, pa ih treba ukloniti. Napravljeno je prema metodi opisanoj u tutorialu http://www.mdtutorials.com/gmx/membrane_protein/03_solvate.html pomoću perl skripte http://www.mdtutorials.com/gmx/membrane_protein/Files/water_deletor.pl. Odabratu neki atom iz ester regije (O7) i neki na dnu lipida (C50) (pomoću `vmd-a`). Brisanje vode iz unutrašnjosti membrane:

```
perl water_deletor.pl -in system_solv.gro -out system_solv_fix.gro -ref O7 -
middle C50 -nwater 3
```

11. Dodavanje iona za neutralizaciju sustava

Ions.mdp:

```
; ions.mdp - used as input into grompp to generate ions.tpr
; Parameters describing what to do, when to stop and what to save
integrator      = steep          ; Algorithm (steep = steepest descent minimization)
emtol           = 1000.0         ; Stop minimization when the maximum force < 1000.0 kJ/mol/nm
emstep         = 0.01           ; Energy step size
nsteps         = 50000          ; Maximum number of (minimization) steps to perform

; Parameters describing how to find the neighbors of each atom and how to calculate the
interactions
nstlist        = 1              ; Frequency to update the neighbor list and long range
forces
cutoff-scheme  = verlet
ns_type        = grid           ; Method to determine neighbor list (simple, grid)
coulombtype    = PME            ; Treatment of long range electrostatic interactions
rcoulomb       = 1.0            ; Short-range electrostatic cut-off
rvdw           = 1.0            ; Short-range Van der Waals cut-off
pbc            = xyz            ; Periodic Boundary Conditions (yes/no)
```

```
gmx grompp -f ions.mdp -c system_solv_fix.gro -p topol.top -o ions.tpr -maxwarn
2
```

```
gmx genion -s ions.tpr -o system_solv_ions.gro -p topol.top -pname NA -nname CL  
-neutral
```

12. Minimizacija, ekvibracija i produkcija su analogne onima kod membranskih simulacija iz ovog odjeljka, s parametrima navedenim u **odjeljku 2.2.2**. Za vrijeme minimizacije i ekvibracije okosnica peptida je fiksirana kako bi se zadržala struktura uzvojnice.

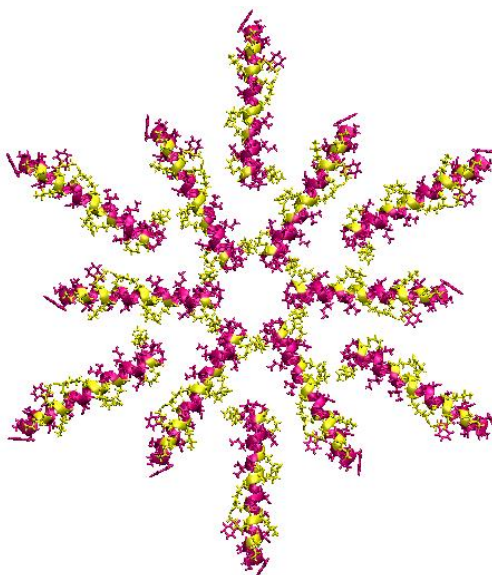
9.1.3 Anisaxin-2S

Početne strukture anisaxina-2S i melitina dobivene su pomoću C-QUARK mrežne aplikacije (<https://zhanggroup.org/C-QUARK/> pristup u siječnju 2022.) [94], a početne konformacije za simulacije pripremljene su pomoću CHARMM-GUI (<https://www.charmm-gui.org/> pristup u siječnju 2022.) *Membrane Buildera* [115], [116].

Procedura kreiranja početnih struktura te minimizacija, ekvilibracija i produkcija, analogne su opisanima u **poglavlju 9.1.1.** za AA simulacije (**odjeljci I i II**). Navest ćemo samo postupak raspoređivanja peptida u oblik zvijezde.

I. Kreiranje rasporeda 12 anisaxina-2S u obliku zvijezde

1. Želimo ih organizirati na sljedeći način



Slika 71 Inicijalni raspored anisaxina-2S u simulacijama AA-12

2. Kreiranje `anisaxin2S_centar_princ.gro` datoteke u kojoj je jedan anisaxin-2S u centru simulacijske kutije sa osi uzvojnice paralelnom x-osi.

```
gmx editconf -f anisaxin2S.gro -center 0 0 0 -anisaxin2S_centar.gro
gmx editconf -f anisaxin2S_centar.gro -o anisaxin2S_centar_princ.gro -princ
```

3. Kreiranje 12 datoteka sa translatiranim adepantinima

`anisaxin2S_12kom_konstrukcija_zvijezde.sh`:

```
#!/bin/bash
for i in 0 30 60 90 120 150 180 210 240 270 300 330
do
gmx editconf -f anisaxin2S_centar_princ.gro -o anisaxin2S_centar_${i}.gro -rotate 0 0 ${i}
done

gmx editconf -f anisaxin2S_centar_0.gro -o anisaxin2S_translatiran_0 -translate 3 0 0
gmx editconf -f anisaxin2S_centar_30.gro -o anisaxin2S_translatiran_30 -translate 4.3 2.5 0
gmx editconf -f anisaxin2S_centar_60.gro -o anisaxin2S_translatiran_60 -translate 1.5 2.6 0
```

```

gmx editconf -f anisaxin2S_centar_90.gro -o anisaxin2S_translatiran_90 -translate 0 5 0
gmx editconf -f anisaxin2S_centar_120.gro -o anisaxin2S_translatiran_120 -translate -1.5 2.6 0
gmx editconf -f anisaxin2S_centar_150.gro -o anisaxin2S_translatiran_150 -translate -4.3 2.5 0
gmx editconf -f anisaxin2S_centar_180.gro -o anisaxin2S_translatiran_180 -translate -3 0 0
gmx editconf -f anisaxin2S_centar_210.gro -o anisaxin2S_translatiran_210 -translate -4.3 -2.5 0
gmx editconf -f anisaxin2S_centar_240.gro -o anisaxin2S_translatiran_240 -translate -1.5 -2.6 0
gmx editconf -f anisaxin2S_centar_270.gro -o anisaxin2S_translatiran_270 -translate 0 -5 0
gmx editconf -f anisaxin2S_centar_300.gro -o anisaxin2S_translatiran_300 -translate 1.5 -2.6 0
gmx editconf -f anisaxin2S_centar_330.gro -o anisaxin2S_translatiran_330 -translate 4.3 -2.5 0

```

```
bash anisaxin2S_12kom_konstrukcija_zvijezde.sh
```

4. Tih 12 strukturnih datoteka spojimo u jednu

```
cat anisaxin2S_translatiran* > anisaxin_12kom_zvijezda.gro
```

Uvijek pri kreiranju nove .gro datoteke moramo provjeriti (izmijeniti) ukupan broj atoma i manualno izbrisati suvišne retke.

5. U konačnoj datoteci `anisaxin_12kom_zvijezda.gro` svih 12 peptida ima istu „chain“ oznaku. Trebamo to izmijeniti tako da svaki peptid ima svoju posebnu „chain“ oznaku. To radimo pomoću niže navedene skripte. Za potrebe skripte datoteku treba preimenovati u `12kom0.pdb`:

```
gmx editconf -f anisaxin_12kom_zvijezda.gro -o 12kom0.pdb
```

Skripta mijenjanje_chain_oznaka.sh:

```

#!/bin/bash

arr=(A B C D E F G H I J K L)
broj1=2

for i in ${!arr[@]}
do
#ukupan broj atoma u anisaxinu2S je 515
broj2=$((broj1+514))
broj3=$((i+1))
awk 'BEGIN{ OFS=FS="" } FNR>=$broj1'&& FNR <=$broj2' && $22=="X"{ $22="{arr[i]}" }1'
12kom$i.pdb > 12kom$broj3.pdb
broj1=$((broj1+515))
done

```

```
bash mijenjanje_chain_oznaka.sh
```

Konačna datoteka s 12 peptida je `12kom12.pdb`

9.2 Dodatni podaci

9.2.1 Adepantin-1

Tablica 9 Početne dimenzije simulacijskih sustava u simulacijama adepantina-1 sa membranama

Oznaka	Broj peptida	Veličina sustava (X × Y × Z) (nm)				
		Gram-	POPC	Gram+	Gram- vanjska membrana	
					2 O-Antigena	0 O-Antigena
AA-0	0					
AA-1a,b	1	8.7 × 8.7 × 14.7	9.4 × 9.4 × 14.7	9.2 × 9.2 × 14.7	9.5 × 9.5 × 28.1	9.5 × 9.5 × 25.0
AA-2	2				-	-
AA-12a,b	12	12.4 × 12.4 × 14.7	13.2 × 13.2 × 16.0	13.0 × 13.0 × 14.7	13.0 × 13.0 × 23.1	13.0 × 13.0 × 26.1
CG-12	12					
CG-24	24	12.5 × 12.5 × 17.7				
CG2AA-12	12					
CG2AA-24	24	12.6 × 12.6 × 17.4				

Tablica 10 Detalji procesa ekvibracije u simulacijama adepantina-1 sa membranama

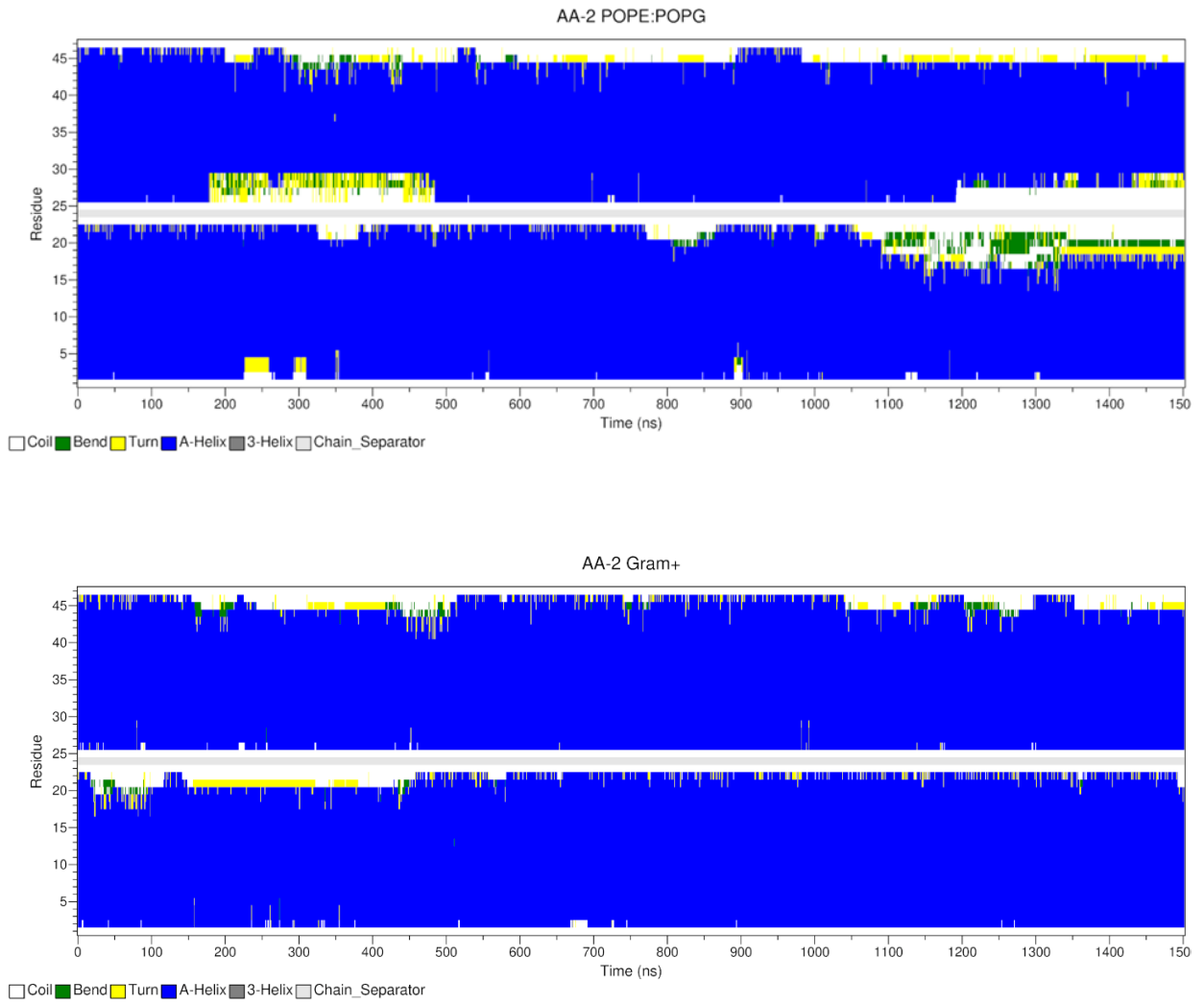
Korak	Ansambl	Vremenski korak dt (fs)	Trajanje (ps)	Konstante sila kcal/(molÅ ²)			
				Ograničenja položaja			Ograničenja dihedralnih kuteva
				Peptidna okosnica	Bočni lanci	P atomi	
1	NVT	1	125	10.0	5.0	2.5	2.5
2	NVT	1	125	5.0	2.5	1.0	1.0
3	NpT	1	125	2.5	1.3	1.0	0.5
4	NpT	2	500	1.3	0.5	0.5	0.5
5	NpT	2	500	0.5	0.1	0.1	0.3
6	NpT	2	500	0.1	0.0	0.0	0.0

Napomena: Gromacs i CHARMM koriste različite jedinice za konstante sila. Mjerna jedinica za konstantu harmonijske sile $k = \frac{F}{x}$ je $\frac{[Energija]}{[duljina]}$. U Gromacsu se konstante sila izražavaju u $\frac{kJ}{nm^2}$, a u CHARMM-u u $\frac{kcal}{mol\text{Å}^2}$. Nadalje, vrijede relacije: $\frac{kcal}{mol} = 4.184 \frac{kJ}{mol}$ i $\frac{kJ}{mol} = 0.239 \frac{kcal}{mol}$.

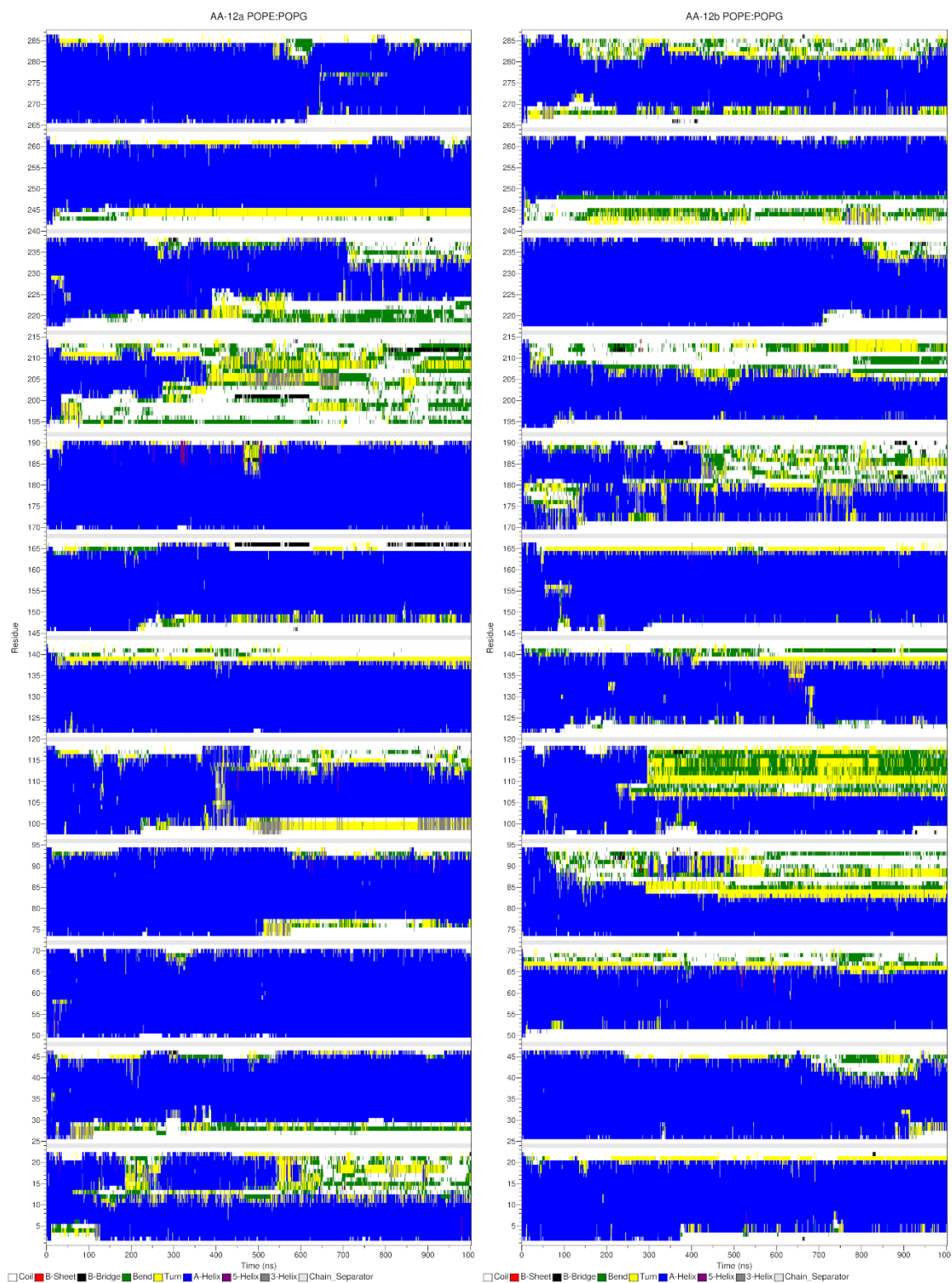
Nekoliko vrijednosti koje se često javljaju u ekvibraciji prikazane su u sljedećoj tablici:

Tablica 11 Neke vrijednosti konstanti sila izražene u mjernim jedinicama koje se koriste u Gromacsu i CHARMM-u.

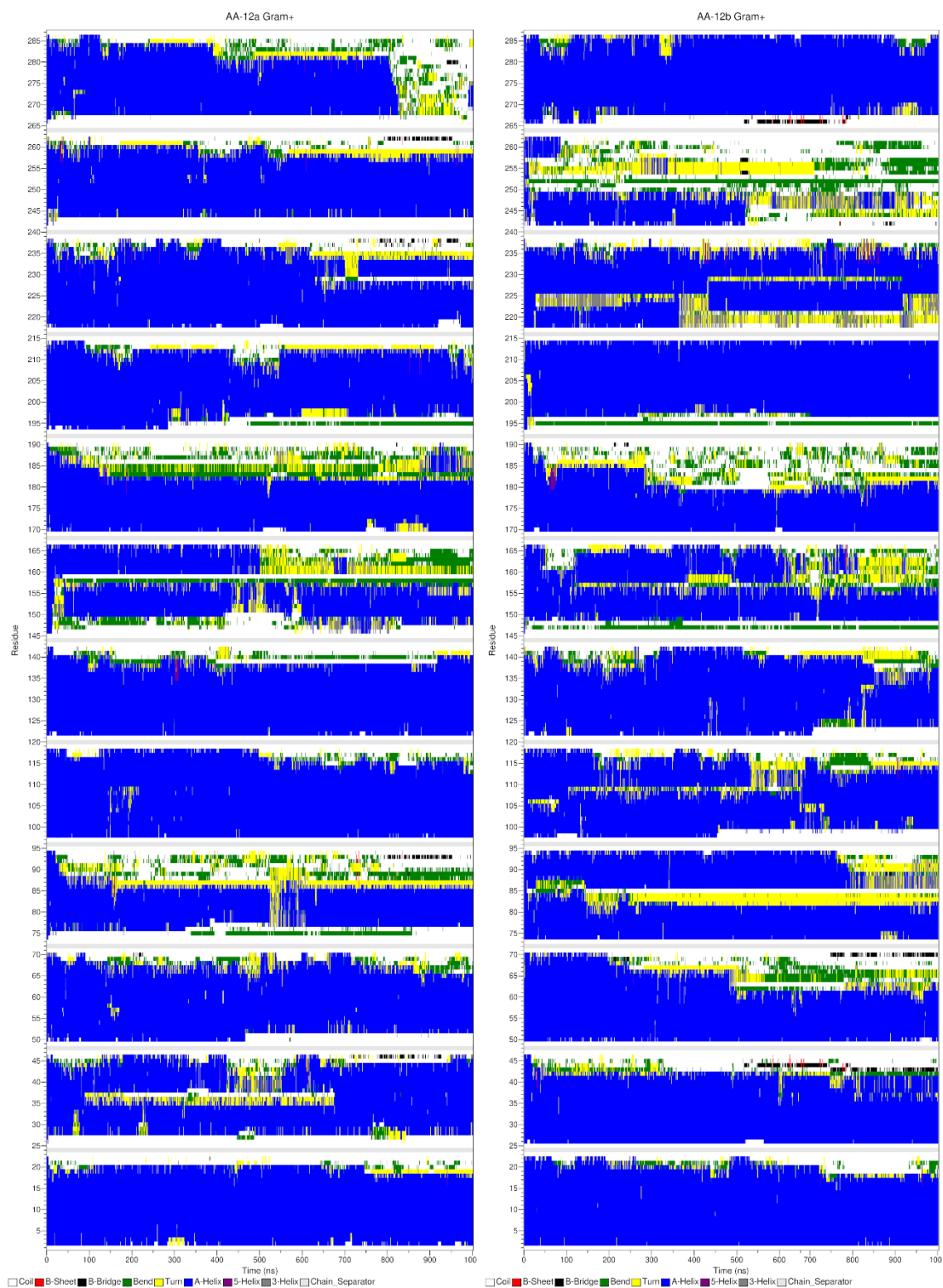
Gromacs	$\frac{kJ}{mol\text{nm}^2}$	4000	2000	1000	500	400	200	100	50
CHARMM	$\frac{kcal}{mol\text{Å}^2}$	10.0	5.0	2.5	1.3	1.0	0.5	0.3	0.1



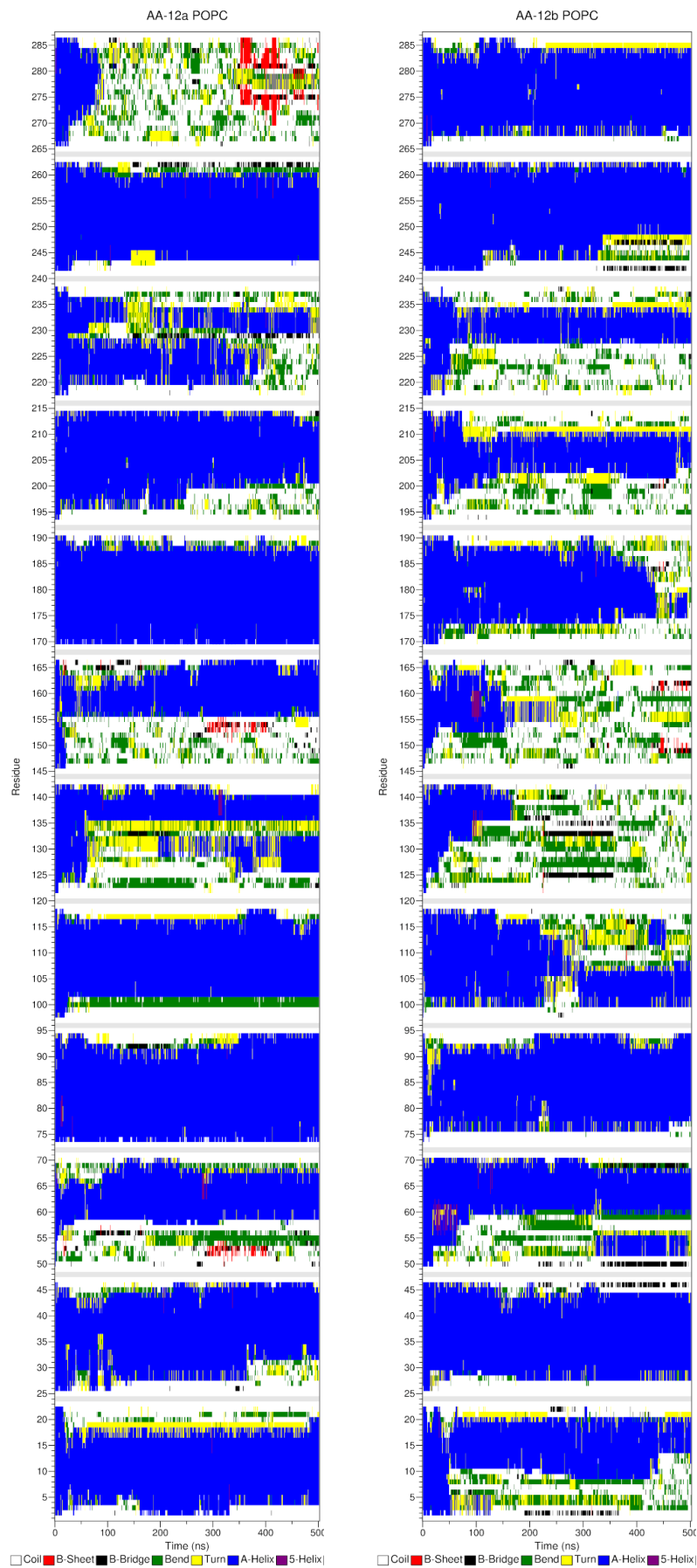
Slika 72 Sekundarna struktura dvaju peptida u AA-2 simulacijama sa POPE:POPG (**gore**) i PG:Lys-PG:CL (**dolje**) membranom. Zamjetna je stabilnost konformacije α -uzvojnice tijekom cijelog vremena simulacije u oba slučaja



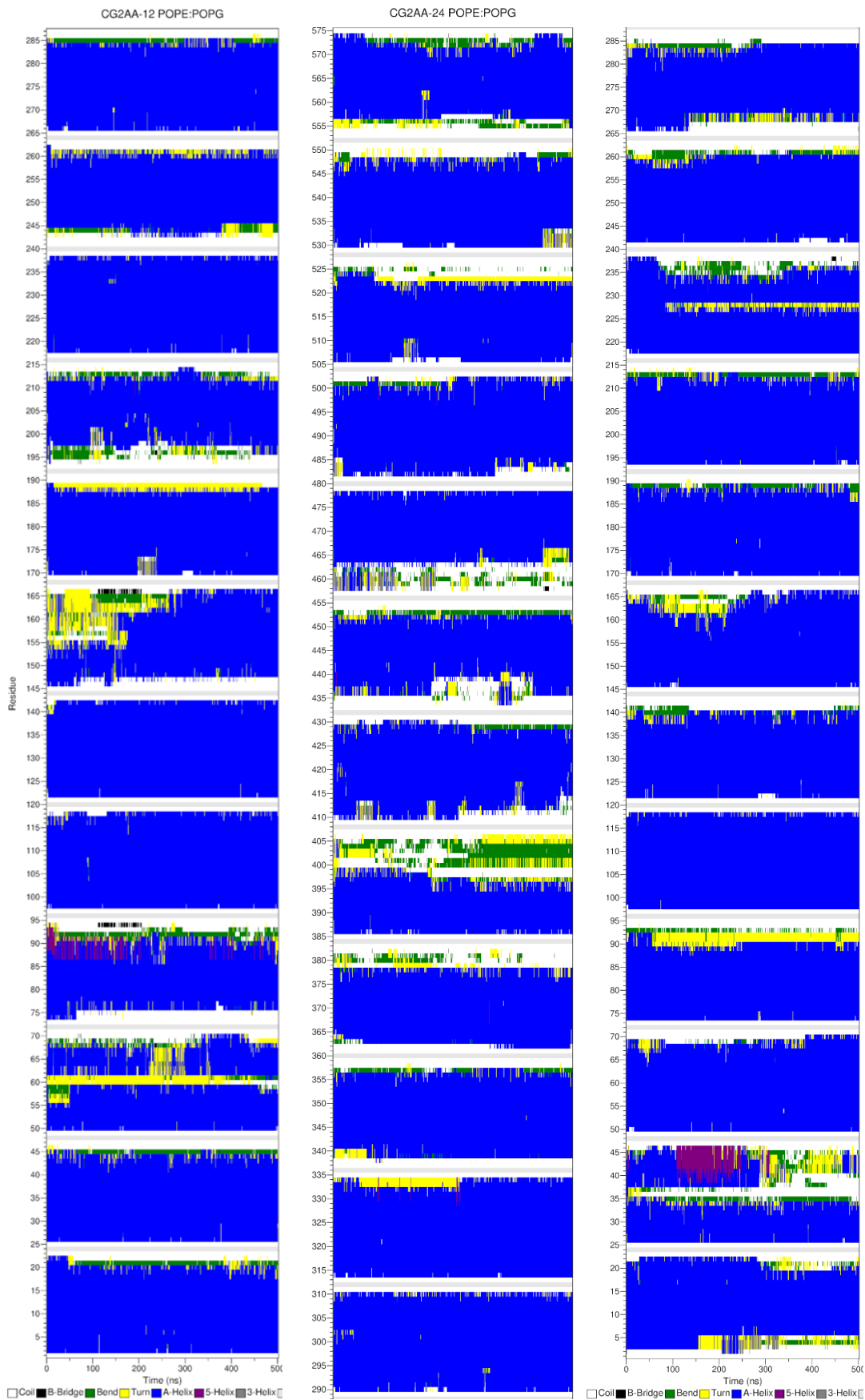
Slika 73 Sekundarna struktura dvanaest peptida u AA-12 POPE:POPG simulacijama, *case1* (lijevo), *case2* (desno).



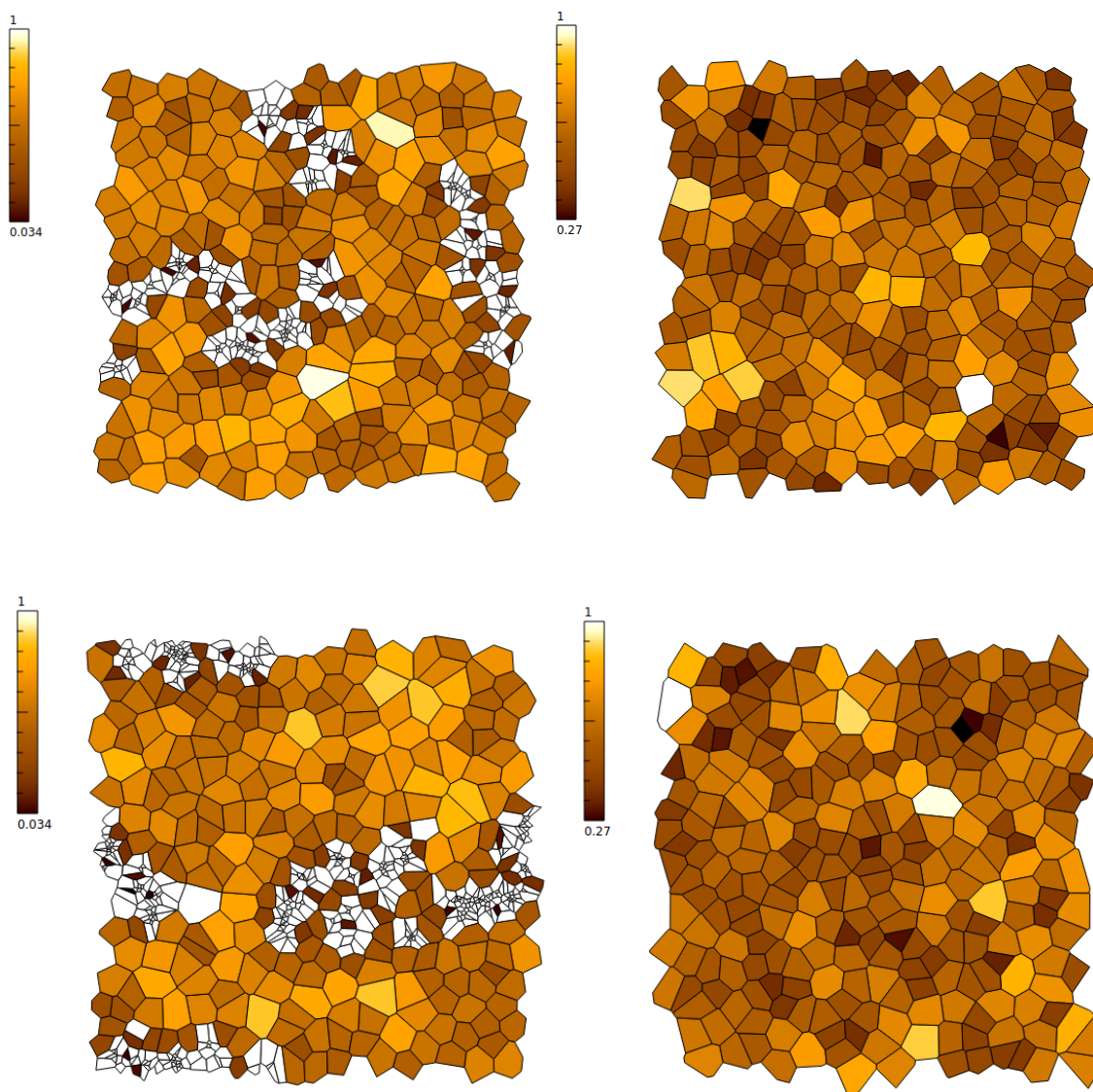
Slika 74 Sekundarna struktura dvanaest peptida u AA-12 PG:LysPG:CL simulacijama, *case1* (lijevo), *case2* (desno).



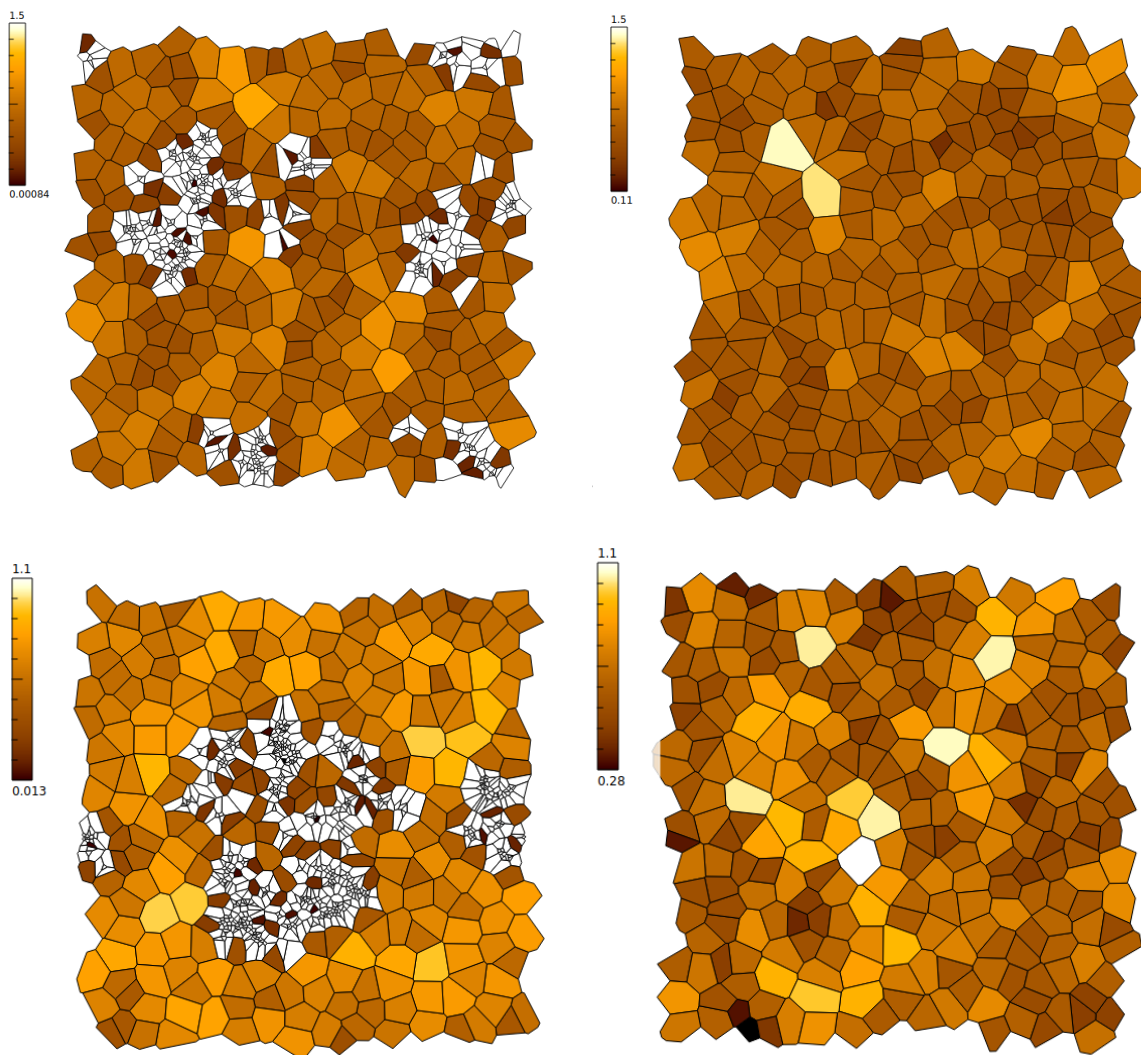
Slika 75 Sekundarna struktura dvanaest peptida u AA-12 POPC simulacijama, *case1* (lijevo), *case2* (desno).



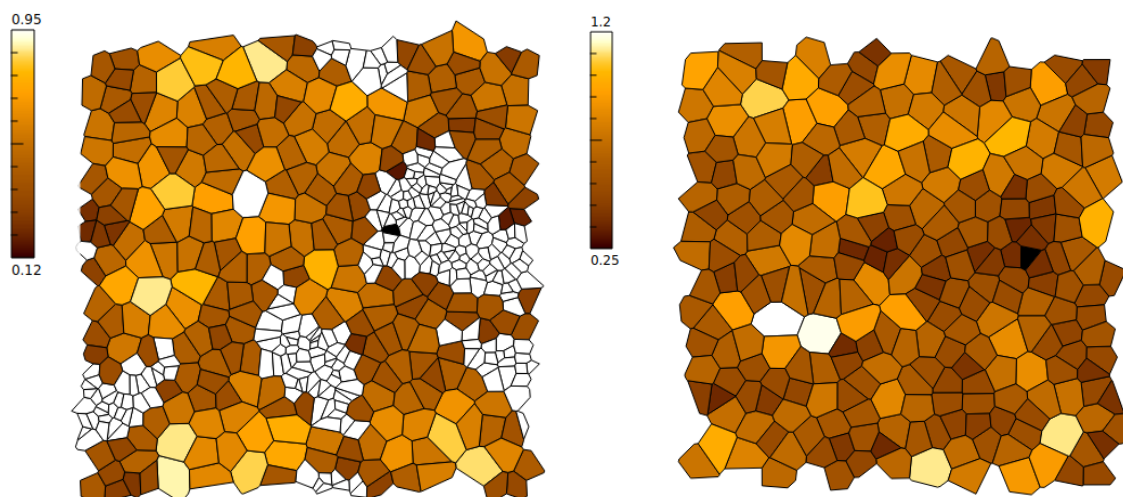
Slika 76 Sekundarna struktura dvanaest peptida u CG2AA-12 (lijevo) i CG2AA-24 (sredina i desno) POPE:POPG simulacijama.



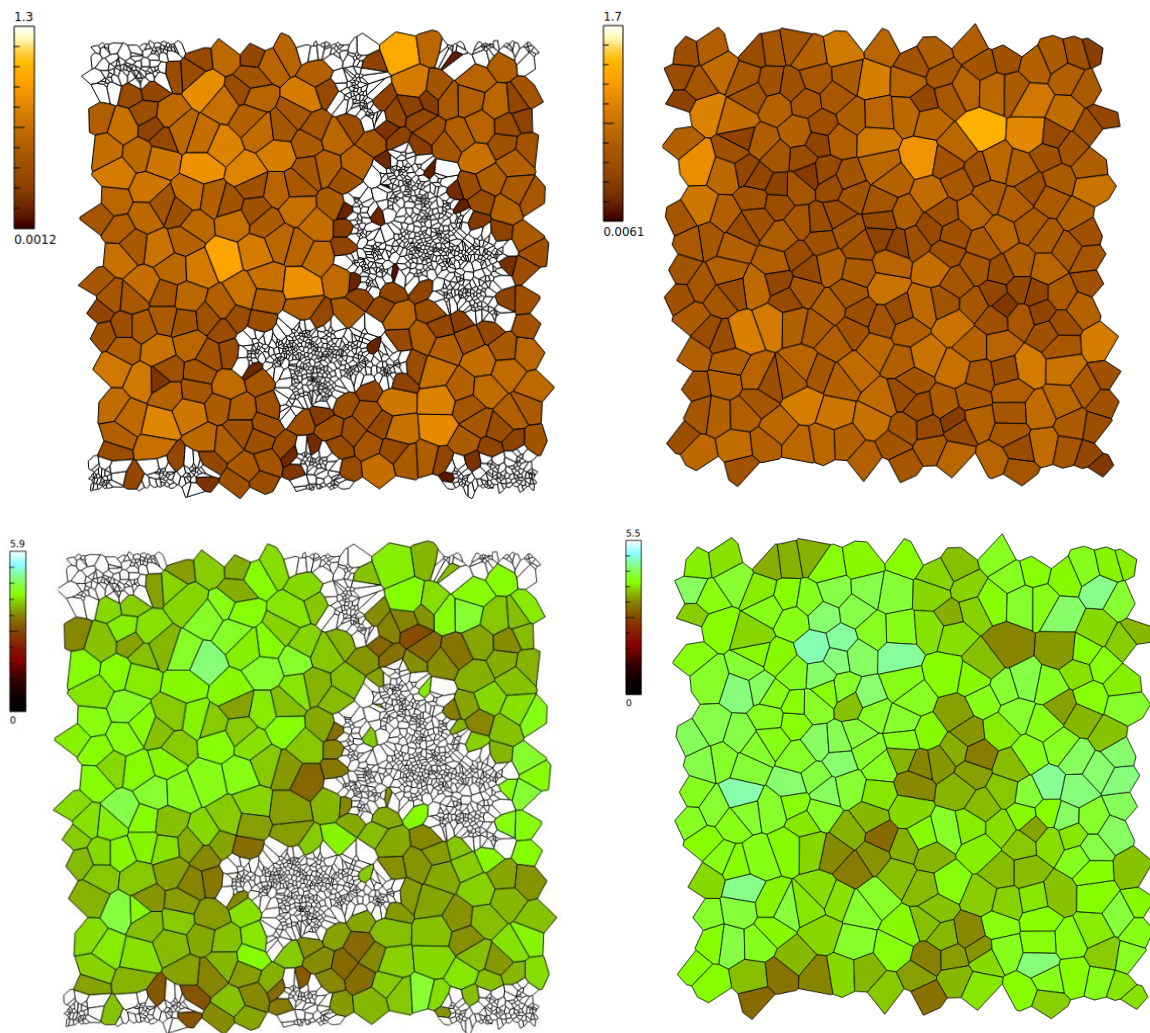
Slika 77 Profili površina lipida u posljednjem stanju ($t = 1\mu\text{s}$) u AA-12 POPE:POPG simulacijama, napravljeni pomoću programa *APL@voro* na temelju Voronoijeve particije površine lipida za odabrane ključne atome (atomi P) u polarnim glavama lipida. *Case1* je u gornjem redu, a *case2* je u donjem redu. Gornji slojevi membrane (s vezanim proteinima) su **lijevo**, dok su donji slojevi **desno**. Brojčane oznake izražene su u nanometrima.



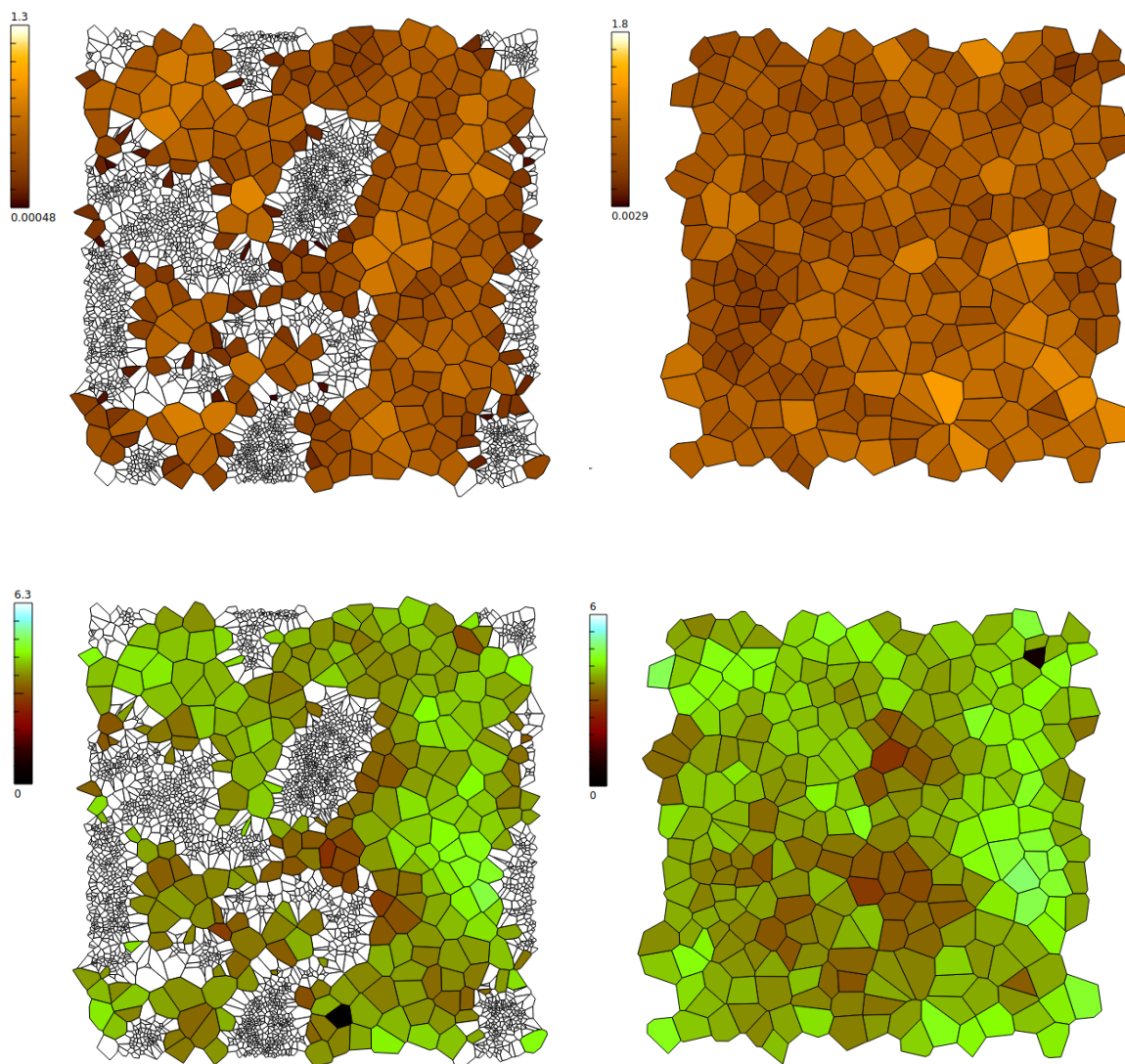
Slika 78 Profili površine lipida u posljednjem stanju ($t = 1\mu\text{s}$) u AA-12 POPE:LysPG:CL simulacijama, napravljeni pomoću programa *APL@voro* na temelju Voronoijeve particije površine lipida za odabrane ključne atome (atomi P) u polarnim glavama lipida. *Case1* je u gornjem redu, a *case2* je u donjem redu. Gornji slojevi membrane (s vezanim proteinima) su **lijevo**, dok su donji slojevi **desno**. Brojčane oznake izražene su u nanometrима.



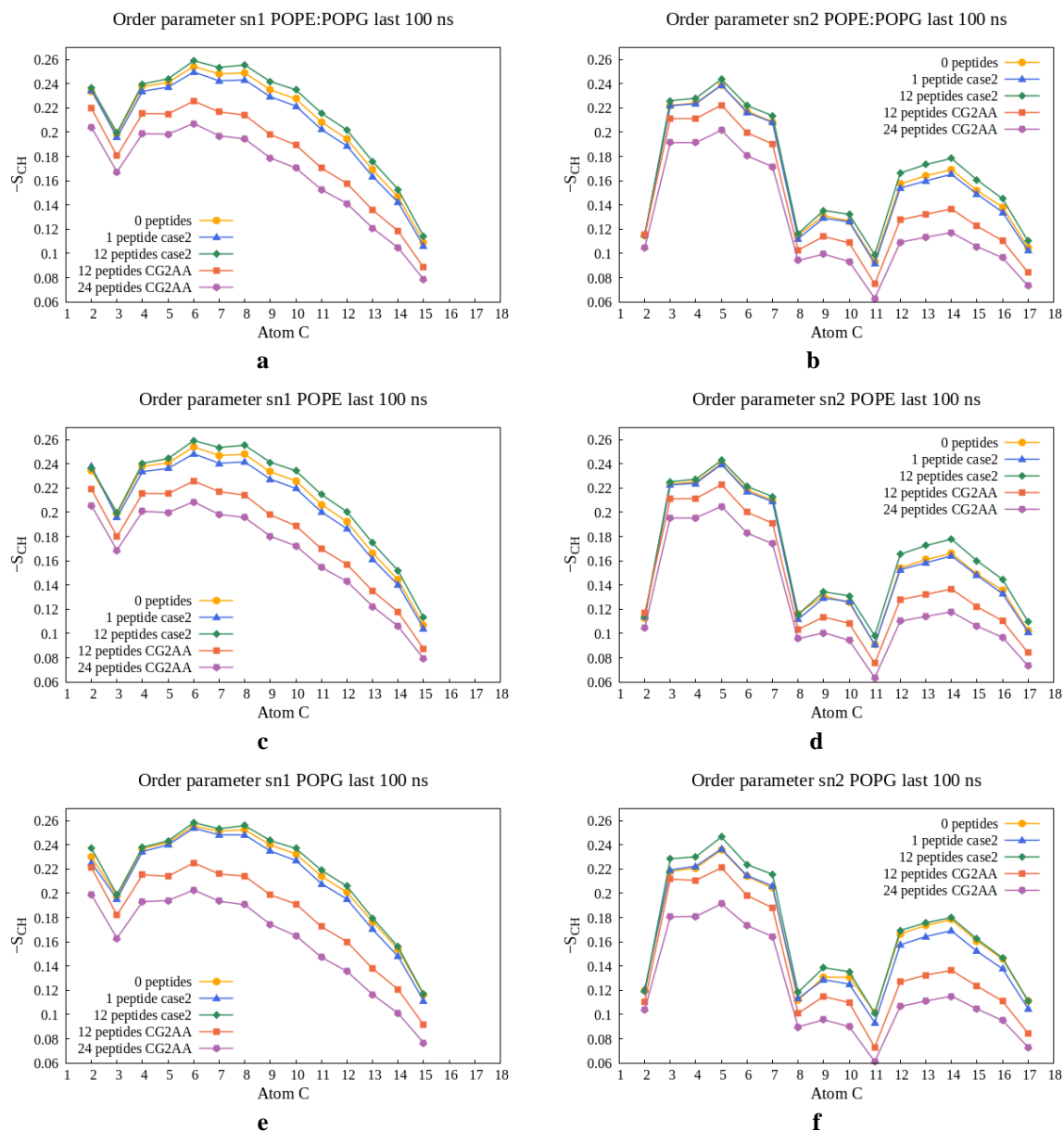
Slika 79 Profili površine lipida u konačnom stanju ($t = 25 \mu\text{s}$) u CG-12 POPE:POPG simulaciji, napravljeni pomoću programa *APL@voro* na temelju Voronoijeve particije površine lipida za odabrane ključne atome (atomi P) u polarnim glavama lipida. Gornji sloj membrane (s vezanim proteinima) je **lijevo**, dok je donji sloj **desno**. Brojčane oznake izražene su u nanometrima.



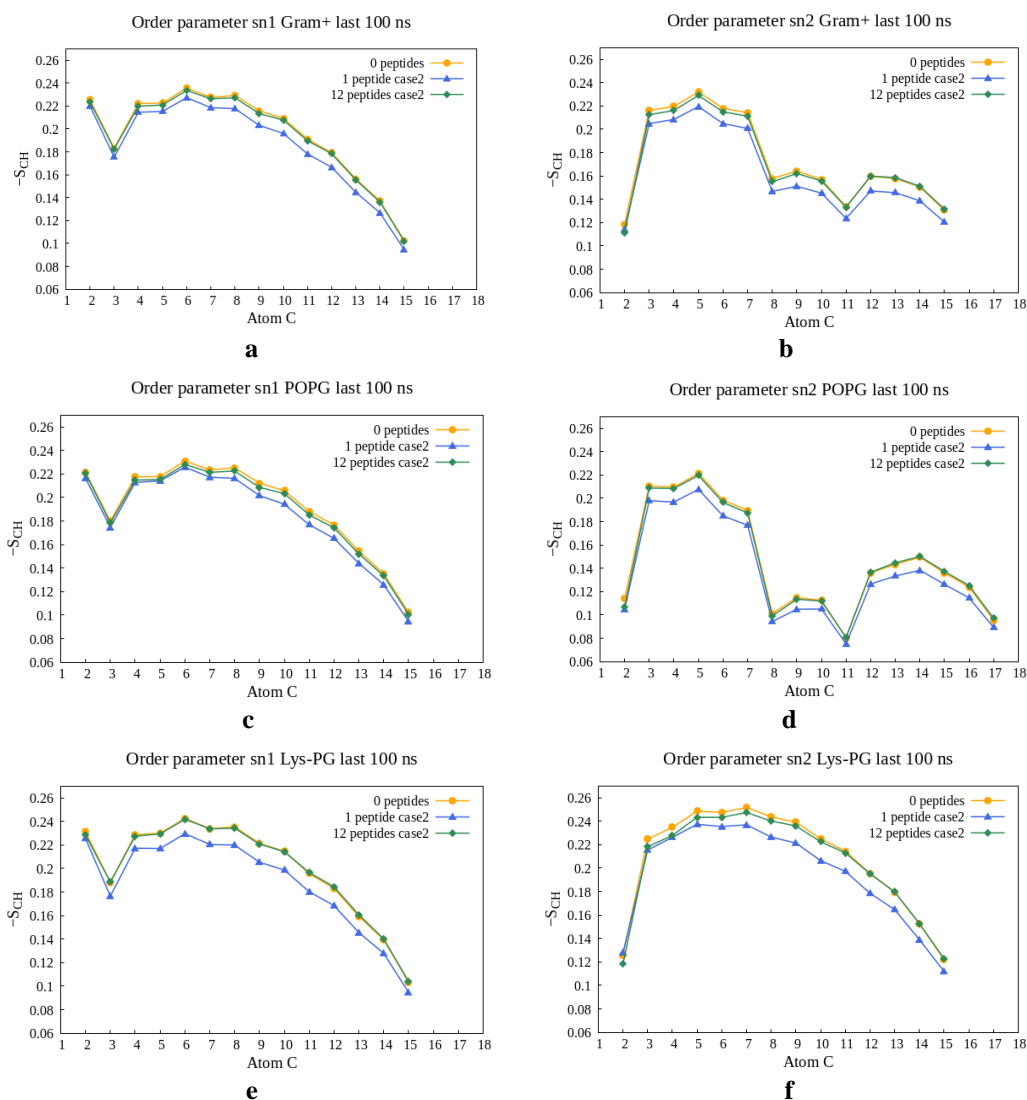
Slika 80 Profili površina lipida (**gornji red**) i debljine membrane (**donji red**) u konačnom stanju ($t = 500$ ns) CG2AA-12 POPE:POPG simulacije, napravljeni pomoću programa *APL@voro* na temelju Voronoijeve particije površine lipida za odabrane ključne atome (atomi P) u polarnim glavama lipida. Gornji sloj membrane (s vezanim proteinima) je **lijevo**, dok je donji sloj **desno**. Brojčane oznake izražene su u nanometrima.



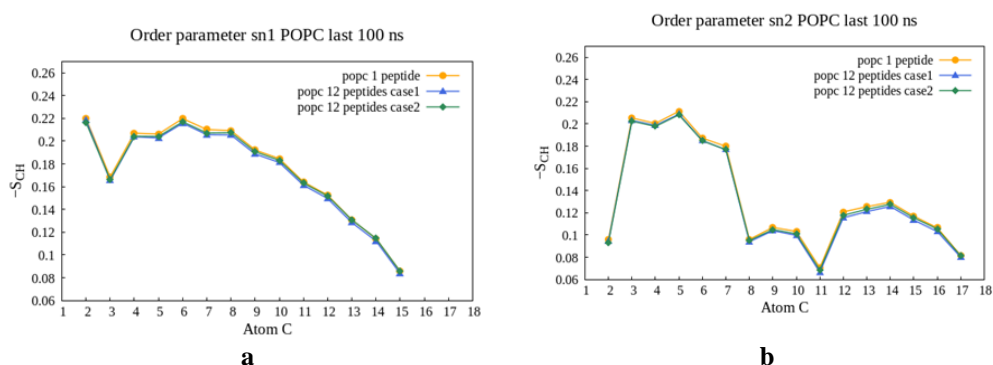
Slika 81 Profili površina lipida (**gornji red**) i debljine membrane (**donji red**) u konačnom stanju ($t = 500$ ns) CG2AA-24 POPE:POPG simulacije, napravljeni pomoću programa *APL@voro* na temelju Voronoijeve particije površine lipida za odabrane ključne atome (atomi P) u polarnim glavama lipida. Gornji sloj membrane (s vezanim proteinima) je **lijevo**, dok je donji sloj **desno**. Brojčane oznake izražene su u nanometrima.



Slika 82 Parametri reda $-S_{CH}$ za acilne lance sn-1 (lijevo) i sn-2 (desno) kao funkcija indeksa atoma ugljika izračunati kao prosjek tijekom zadnjih 100 ns simulacije pomoću Gromacsovog programa *order*. Prikazani su rezultati za simulacije s Gram-negativnom membranom (AA-0, AA-1b, AA-12b, CG2AA-12, CG2AA-24), s rezultatima za POPE:POPG lipide u prvom redu (**a**, **b**), POPE u drugom redu (**c**, **d**) i za POPG lipide u trećem redu (**e**, **f**).

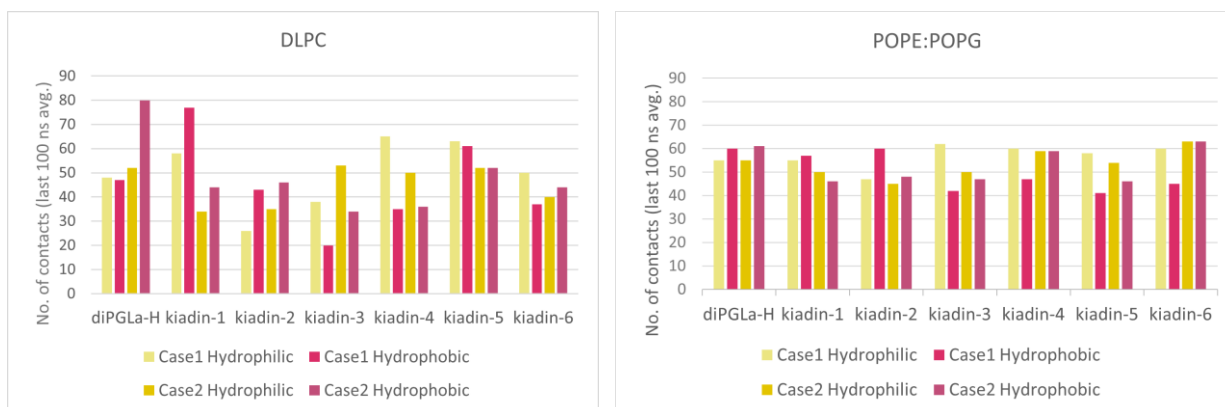


Slika 83 Parametri reda $-S_{CH}$ za acilne lance sn-1 (lijevo) i sn-2 (desno) kao funkcija indeksa atoma ugljika izračunati kao prosjek tijekom zadnjih 100 ns simulacija pomoću Gromacsovog programa *order*. Prikazani su rezultati za slučajeve simulacije s Gram-pozitivnom membranom (AA-0, AA-1b, AA-12b), s rezultatima za sve lipide u prvom redu (**a**, **b**), POPG lipide u drugom redu (**c**, **d**) i za Lys-PG lipide u trećem redu (**e**, **f**).

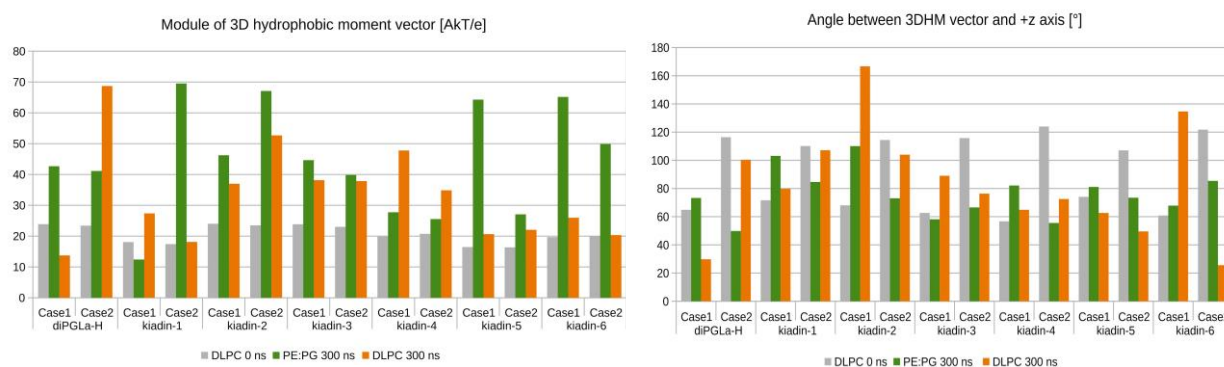


Slika 84 Parametri reda $-S_{CH}$ za acilne lance sn-1 (lijevo) i sn-2 (desno) kao funkcija indeksa atoma ugljika izračunati kao prosjek tijekom zadnjih 100 ns simulacije pomoću Gromacsovog programa *order*. Rezultati pokazuju POPC lipide za slučajeve simulacije s neutralnom membranom (AA-1, AA-12a, AA-12b).

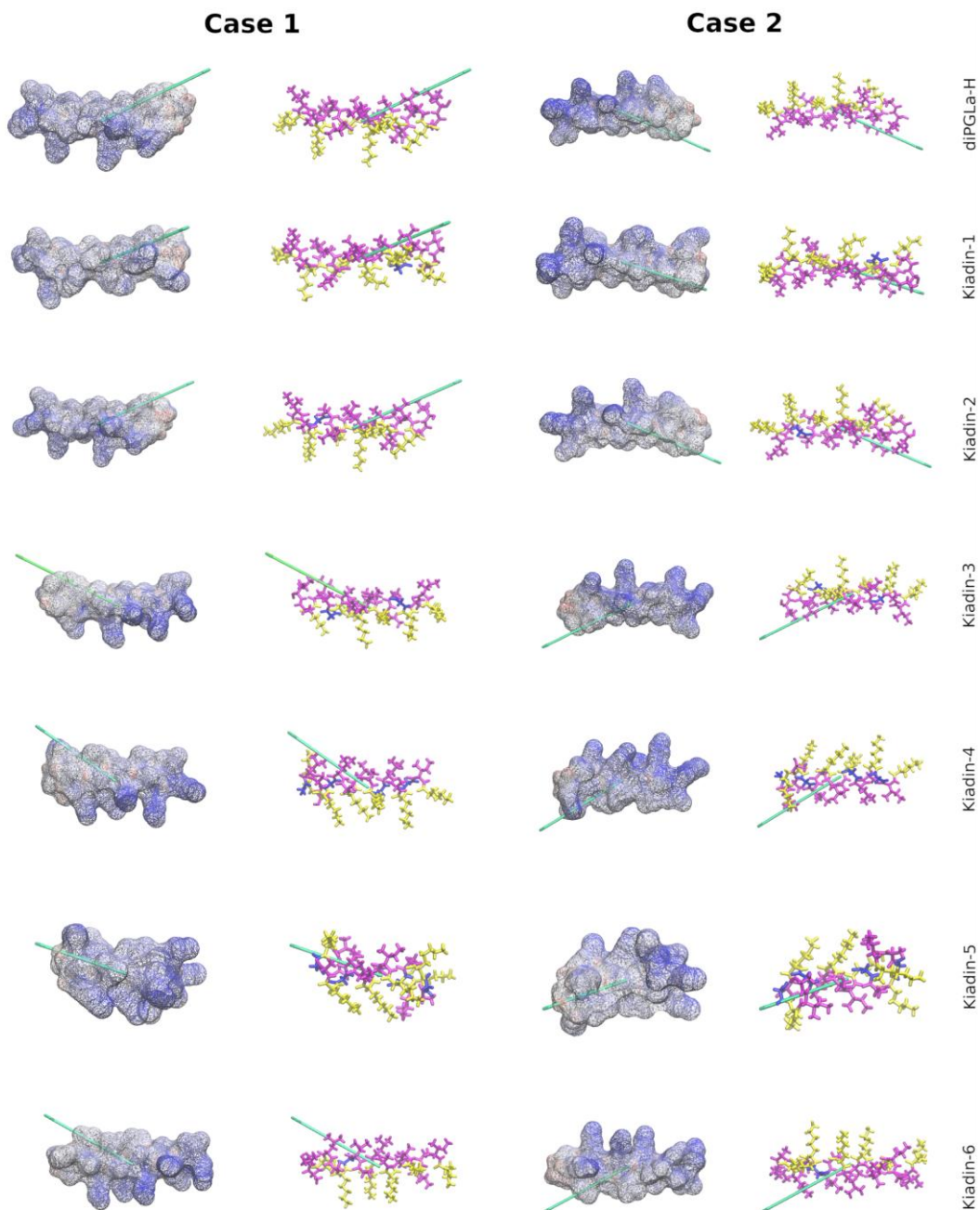
9.2.2 Kiadini



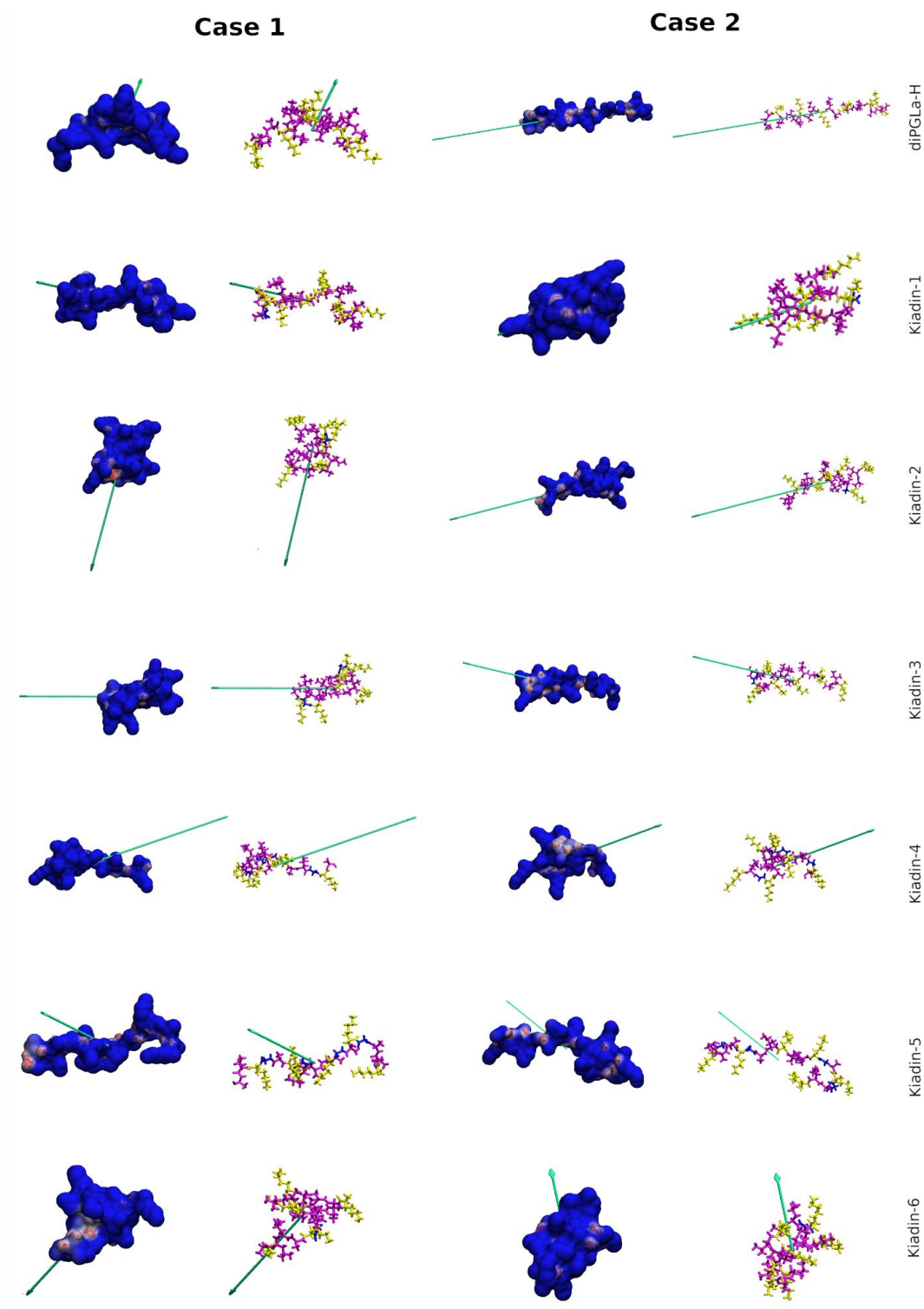
Slika 85 Prosječan broj kontakata tijekom zadnjih 100 ns simulacije između hidrofilnih (Lys) odnosno hidrofobnih (Ile, Val, Ala, Leu) regija peptida i P atoma DLPC (**lijevo**) i POPE:POPG membrane (**desno**) određen Gromacsovim programom *mindist*. Rezultati su izvedeni iz onih prikazanih na **sl. 47**. Za svaki peptid, histogrami pokazuju prosječan broj kontakata za *case1* i *case2* i svaku vrstu membrane, kako je naznačeno.



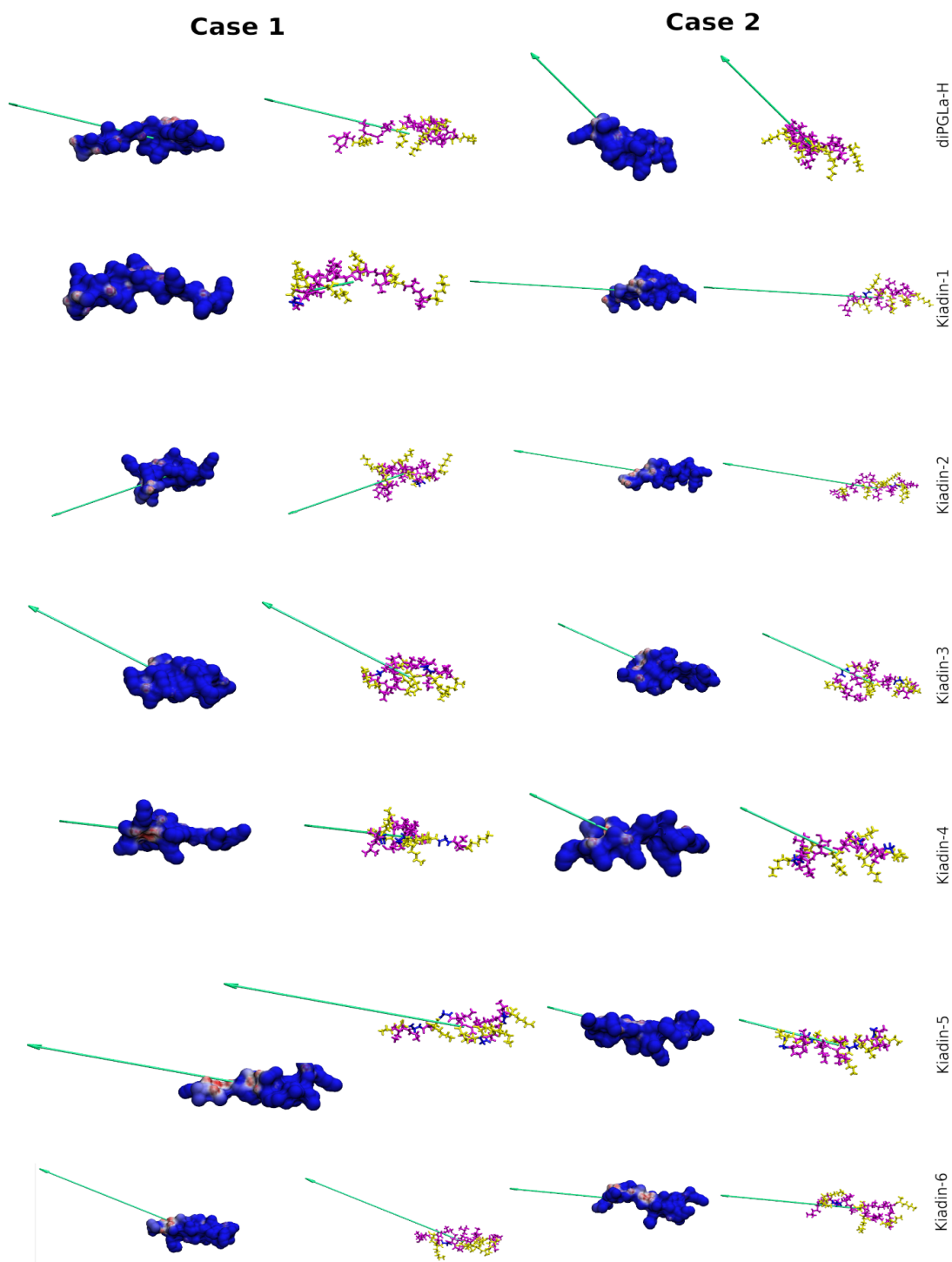
Slika 86 Iznos 3D-HM vektora i kut između 3D-HM vektora i +z osi (os okomita na površinu membrane), u simulacijama kiadina. Izračunato za stanja u 0 ns i 300 ns.



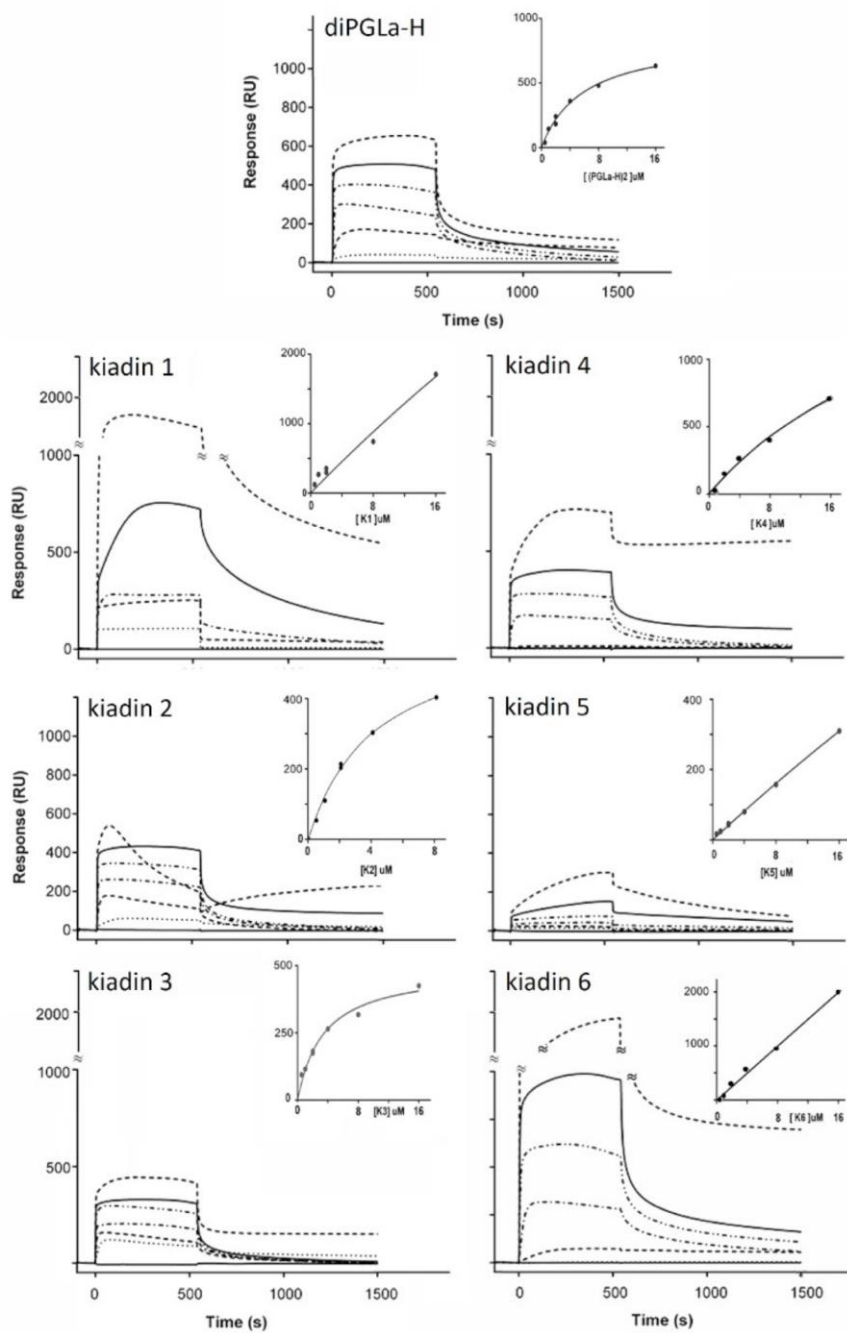
Slika 87 Vizualni prikaz 3D-HM rezultata za kiadine i diPGLa-H u trenutku 0 ns. Prikazana je raspodjela elektrostatskog potencijala na površini peptida dostupnoj otapalu i struktura peptida sa polarnim ostacima prikazanim u žutoj, a hidrofobnim u magenta boji, sa izračunatim 3D-HM vektorom (zeleni vektor). Lijeva strana predstavlja *case1* gdje je peptid okrenut prema membrani svojom polarnom stranom, a desna strana *case2* kada je hidrofobna strana peptida prema membrani, dok svaki red predstavlja označeni peptid (**desno**). Imajte na umu da su strukture za dva slučaja suptilno različite nakon koraka ravnoteže. Potencijal površine predstavljen je korištenjem transparentnog načina kako bi 3D-HM vektor bio vidljiv.



Slika 88 Prikaz 3D-HM rezultata u trenutku 300 ns za kiadine i *diPGLa-H* u interakciji s DLPC membranom (nije prikazana radi preglednosti). 3D-HM vektor je obojen zeleno, polarni ostaci prikazani su u žutoj, a hidrofobni u magenta boji. Ista struktura prikazana je i preko elektrostatskog potencijala na površini peptida (pozitivno nabijeni dijelovi su plavi, a negativni crveni). Lijeva strana predstavlja *case1* gdje je peptid na početku bio okrenut prema membrani svojom polarnom stranom, a desna strana *case2* kada je hidrofobna strana peptida prema membrani, dok svaki red predstavlja označeni peptid.

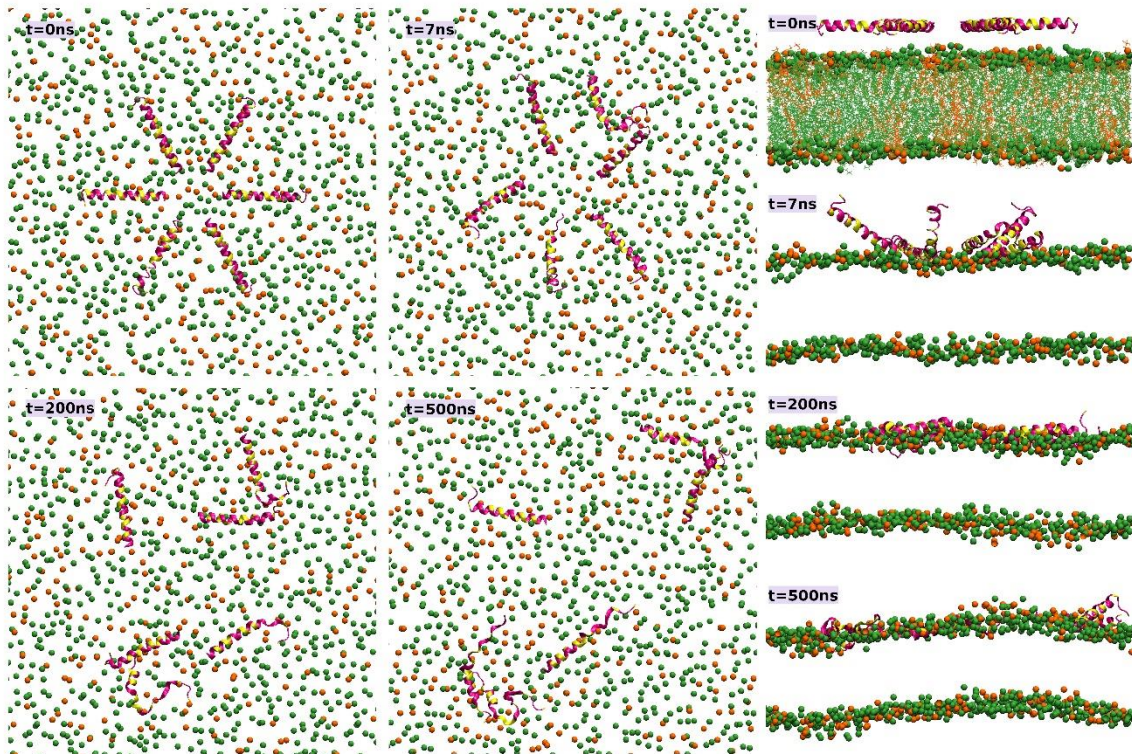


Slika 89 Prikaz 3D-HM rezultata u trenutku 300 ns za kiadine i *diPGLa-H* u interakciji s POPE:POPG membranom (nije prikazana radi preglednosti). 3D-HM vektor je obojen zeleno, polarni ostaci prikazani su u žutoj, a hidrofobni u magenta boji. Ista struktura prikazana je i preko elektrostatskog potencijala na površini peptida (pozitivno nabijeni dijelovi su plavi, a negativni crveni). Lijeva strana predstavlja *case1* gdje je peptid na početku bio okrenut prema membrani svojom polarnom stranom, a desna strana *case2* kada je hidrofobna strana peptida prema membrani, dok svaki red predstavlja označeni peptid.

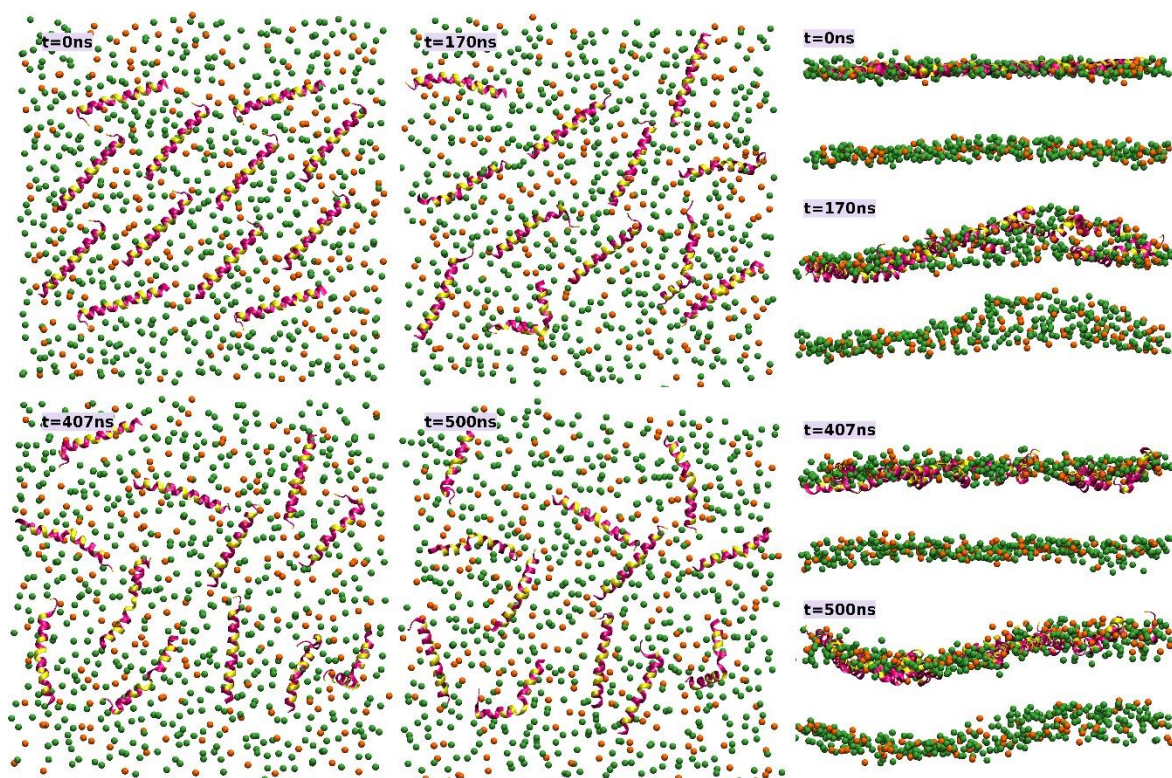


Slika 90 Senzogrami površinske plazmonske rezonancije (SPR) pri vezanju kiadina na neutralne DOPC LUV-ove i odgovarajuće krivulje vezanja (umetni na slikama) određene korištenjem matematičkog modela "stacionarnog afiniteta" sa softverom Biacore BiaEvaluation. Koncentracije peptida su se sukcesivno povećavale od 0.5 μM (.....), 1 μM (-----), 2 μM (-.-.-.-), 4 μM (-.-.-.-.-), 8 μM (—) i 16 μM (-----), uz ispiranje puferom nakon svakog mjerenja. Prikazani rezultati su dio kolaboracije Rončević T., Maleš M., Sonavane Y., Guida F., Pacor S., Tossi A., Zoranić L., rad u pripremi.

9.2.3 Anisaxin-2S



Slika 91 Početno (0 ns), dva karakteristična (7 ns i 200 ns) i konačno stanje (500 ns) u simulaciji II-b (interakcija šest anisaxin-2S peptida inicijalno smještenih u zvjezdastu formaciju ~2 nm iznad POPE:POPG membrane). Slike prikazuju pogled odozgo i sa strane u naznačenim trenucima. Peptidi su prikazani u obliku vrpce (žuto - nabijeni ostaci, magenta - preostale AA). Membrana je predstavljena s atomima P prikazanim kuglicama, a acilni lanci linijama (POPE – zelena; POPG – narančasta). Ostali atomi i molekule vode nisu prikazani radi preglednosti.



Slika 92 Početno (0 ns) dva karakteristična (170 ns i 407 ns) i konačno (500 ns) stanje u simulaciji III-2 (interakcija 12 anisaxin-2S peptida inicijalno nepravilno raspoređenih i umetnutih u polarnu regiju POPE:POPG membrane). Slike prikazuju pogled odozgo i sa strane u naznačenim trenutcima. Raspored boja analogan je onima na sl. 91.

9.3 Skripte za analize

1. Eliminiranje artefakata uzrokovanih periodičnošću

trjcat_nopbc.sh:

```
#!/bin/bash
gmx trjcat -f md1.xtc traj_comp.part0002.xtc traj_comp.part0003.xtc traj_comp.part0004.xtc
traj_comp.part0005.xtc -o md500ns.xtc
tpr=5
ns=500
echo 0 | gmx trjconv -s md"$tpr".tpr -f md"$ns"ns.xtc -o nopbc_"$ns"_whole.xtc -pbc whole
echo 0 | gmx trjconv -s md"$tpr".tpr -f nopbc_"$ns"_whole.xtc -o nopbc_"$ns"_whole_mol.xtc
-pbc mol
```

2. DSSP

ps.m2p:

```
; Matrix options
title = yes
titlefont = Helvetica ; Matrix title Postscript Font name
titlefontsize = 24.0 ; Matrix title Font size (pt)
legend = no ; Show the legend
legendfont = Helvetica ; Legend name Postscript Font name
legendfontsize = 20.0 ; Legend name Font size (pt)
;legendlabel ; Used when there is none in the .xpm
;legend2label ; Id. when merging two xpm's

xbox = 0.15 ; x-size of a matrix element
ybox = 15.0 ; y-size of a matrix element
matrixspacing = 45.0 ; Space between 2 matrices
xoffset = 0.0 ; Between matrix and bounding box
yoffset = 0.0 ; Between matrix and bounding box

; X-axis options
x-lineat0value = no ; Draw line at matrix value==0
x-major = 100.0 ; Major tick spacing (ako je -tu ns, onda u nanosekundama)
x-minor = 50.0 ; Id. Minor ticks (ako je -tu ns, onda u nanosekundama)
x-firstmajor = 0.0 ; Offset for major tick
x-majorat0 = no ; Additional Major tick at first frame
x-majorticklen = 12.0 ; Length of major ticks
x-minorticklen = 6.0 ; Id. Minor ticks
x-label = ; Used when there is none in the .xpm
x-font = Helvetica ; Axis label PostScript Font
x-fontsize = 20 ; Axis label Font size (pt)
x-tickfont = Helvetica ; Tick label PostScript Font
x-tickfontsize = 18 ; Tick label Font size (pt)

; Y-axis options
y-lineat0value = no
y-major = 5.0
y-minor = 1.0
y-firstmajor = 0.0
y-majorat0 = no
y-majorticklen = 12.0
y-minorticklen = 6.0
y-label =
y-fontsize = 20
y-font = Helvetica
y-tickfontsize = 18
y-tickfont = Helvetica
```

dssp.sh:

```
#!/bin/bash
```

```
#DSSP: (prebaciti fajl ps.m2p prethodno u radni folder)
export DSSP=/usr/bin/dssp
echo 5 | gmx do_dssp -f noPBC_1600ns_whole_mol.xtc -s md16.tpr -sc scount.xvg -o ss.xpm -
tu ns -dt 1
# Otvoriti ss.xpm u tekstualnom editoru i po zelji promijeniti title
gmx xpm2ps -f ss.xpm -o dssp.eps -di ps.m2p -bx 1 -by 10
# Otvoriti .xvg datoteku u tekstualnom editoru i po zelji promijeniti title
# xmgrace scount.xvg
xmgrace -nxy scount.xvg
```

3. Gustoća

Primjer iz simulacije AA-1b POPE:POPG

density.sh:

```
#!/bin/bash

#Kreriranje .ndx datoteke:
printf "r LYS\n r ILE | r VAL | r ALA | r LEU\n 13 | 14\n a P\n q\n" | gmx make_ndx -f
step5_input.gro -o index_hidrophaty_zagustoce.ndx

#gmx density osrednjeno od 95 do 105 ns:
echo 0 1 18 19 21 | gmx density -s md16.tpr -f noPBC_1600ns.xtc -n
index_hidrophaty_zagustoce.ndx -o gustoce_hidrophaty_95_do_105ns.xvg -center -d Z -b 95000
-e 105000 -ng 4

gnuplot gnuplot_gustoca_hidrophaty_95_do_105ns
```

Gnuplot skripta gnuplot_gustoca_hidrophaty_95_do_105ns:

```
set terminal pngcairo
set output 'gustoca_95_do_105ns.png'
set title "1 peptide POPE:POPG case2 95-105 ns"

set encoding utf8
set minussign

unset grid
#set ylabel "numcont"
set ylabel "Density kg/m^3"
set xlabel "Distance from bilayer center (nm)"

set border linewidth 1.3
#set xtics 20
#set ytics 0.2
#set mxtics 2
#set mytics 2

set xtics nomirror
set ytics nomirror

#set xtics format ""
#set ytics format ""
set key top right font "Times-New-Roman, 14"
#set xrange [ 0 : 150]
set yrange [0 : 60]

set xtics font "Times-New-Roman, 20"
set ytics font "Times-New-Roman, 20"
set xlabel font "Times-New-Roman, 20"
set ylabel font "Times-New-Roman, 20"
set title font "Times-New-Roman, 20"
```

```
#set tics scale 2
#set size ratio 0.5

set bmargin 4
set lmargin 9

set colorsequence classic

plot "gustoce_hidrophaty_95_do_105ns.svg" using ($1):($2) with lines ls 1 lt rgb "black"
lw 3 title "peptide",\
    "gustoce_hidrophaty_95_do_105ns.svg" using ($1):($3) with lines ls 1 lt rgb "gold" lw
3 title "Lys",\
    "gustoce_hidrophaty_95_do_105ns.svg" using ($1):($4) with lines ls 1 lt rgb "magenta"
lw 3 title "hydrophobic",\
    "gustoce_hidrophaty_95_do_105ns.svg" using ($1):($5) with lines ls 1 lt rgb "sea-
green" lw 3 title "P",\
```

4. Parametar reda

Primjer iz simulacije AA-12b POPE:POPG:

order_last100ns.sh:

```
#!/bin/bash

printf "del 0-20\n a C31\n a C32\n a C33\n a C34\n a C35\n a C36\n a C37\n a C38\n a C39\n
a C310\n a C311\n a C312\n a C313\n a C314\n a C315\n a C316\n q\n" | gmx make_ndx -f
md10.tpr -o sn1_pepg.ndx

printf "del 0-20\n a C21\n a C22\n a C23\n a C24\n a C25\n a C26\n a C27\n a C28\n a C29\n
a C210\n a C211\n a C212\n a C213\n a C214\n a C215\n a C216\n a C217\n a C218\n q\n" |
gmx make_ndx -f md10.tpr -o sn2_pepg.ndx

printf "del 0-20\n r POPE & a C31\n r POPE & a C32\n r POPE & a C33\n r POPE & a C34\n r
POPE & a C35\n r POPE & a C36\n r POPE & a C37\n r POPE & a C38\n r POPE & a C39\n r POPE
& a C310\n r POPE & a C311\n r POPE & a C312\n r POPE & a C313\n r POPE & a C314\n r POPE
& a C315\n r POPE & a C316\n q\n" | gmx make_ndx -f md10.tpr -o sn1_pope.ndx

printf "del 0-20\n r POPE & a C21\n r POPE & a C22\n r POPE & a C23\n r POPE & a C24\n r
POPE & a C25\n r POPE & a C26\n r POPE & a C27\n r POPE & a C28\n r POPE & a C29\n r POPE
& a C210\n r POPE & a C211\n r POPE & a C212\n r POPE & a C213\n r POPE & a C214\n r POPE
& a C215\n r POPE & a C216\n r POPE & a C217\n r POPE & a C218\n q\n" | gmx make_ndx -f
md10.tpr -o sn2_pope.ndx

printf "del 0-20\n r POPG & a C31\n r POPG & a C32\n r POPG & a C33\n r POPG & a C34\n r
POPG & a C35\n r POPG & a C36\n r POPG & a C37\n r POPG & a C38\n r POPG & a C39\n r POPG
& a C310\n r POPG & a C311\n r POPG & a C312\n r POPG & a C313\n r POPG & a C314\n r POPG
& a C315\n r POPG & a C316\n q\n" | gmx make_ndx -f md10.tpr -o sn1_popg.ndx

printf "del 0-20\n r POPG & a C21\n r POPG & a C22\n r POPG & a C23\n r POPG & a C24\n r
POPG & a C25\n r POPG & a C26\n r POPG & a C27\n r POPG & a C28\n r POPG & a C29\n r POPG
& a C210\n r POPG & a C211\n r POPG & a C212\n r POPG & a C213\n r POPG & a C214\n r POPG
& a C215\n r POPG & a C216\n r POPG & a C217\n r POPG & a C218\n q\n" | gmx make_ndx -f
md10.tpr -o sn2_popg.ndx

gmx order -s md10.tpr -f noPBC_1000ns_whole_mol.xtc -n sn1_pepg.ndx -d z -b 900000 -e
1000000 -o order_sn1_pepg.svg -od deuter_sn1_pepg_12kom_last100ns_case2.svg

gmx order -s md10.tpr -f noPBC_1000ns_whole_mol.xtc -n sn2_pepg.ndx -d z -b 900000 -e
1000000 -o order_sn2_pepg.svg -od deuter_sn2_pepg_12kom_last100ns_case2.svg

gmx order -s md10.tpr -f noPBC_1000ns_whole_mol.xtc -n sn1_pope.ndx -d z -b 900000 -e
1000000 -o order_sn1_pope.svg -od deuter_sn1_pope_12kom_last100ns_case2.svg

gmx order -s md10.tpr -f noPBC_1000ns_whole_mol.xtc -n sn2_pope.ndx -d z -b 900000 -e
1000000 -o order_sn2_pope.svg -od deuter_sn2_pope_12kom_last100ns_case2.svg
```

```
gmx order -s md10.tpr -f noPBC_1000ns_whole_mol.xtc -n sn1_popg.ndx -d z -b 900000 -e
1000000 -o order_sn1_popg.svg -od deuter_sn1_popg_12kom_last100ns_case2.svg
```

```
gmx order -s md10.tpr -f noPBC_1000ns_whole_mol.xtc -n sn2_popg.ndx -d z -b 900000 -e
1000000 -o order_sn2_popg.svg -od deuter_sn2_popg_12kom_last100ns_case2.svg
```

Gnuplot skripta gnuplot_order_sn1:

```
set terminal pngcairo font "Times-New-Roman, 12" size 600, 400
unset grid
set ylabel "-S_{CH}"
set xlabel "Atom C"

set border linewidth 1.0
set xtics 1
set ytics 0.02
#set mxtics 2
#set mytics 2

set xtics nomirror
set ytics nomirror

#set xtics format ""
#set ytics format ""
#set key left bottom
set xrange [ 1 : 18]
set yrange [0.06 : 0.27]

set xtics font "Times-New-Roman, 12" offset 0,0.3,0
set ytics font "Times-New-Roman, 12"
set xlabel font "Times-New-Roman, 14" offset 0,0.7,0
set ylabel font "Times-New-Roman, 14" offset 1,0,0
set title font "Times-New-Roman, 16"
set tics scale 0.5
#set size ratio 0.6
#set tmargin 3

set colorsequence classic

set style data linespoints
set style line 1 lw 1.5 lc rgb "orange" ps 1.2 pt 7 pi 1
set style line 2 lw 1.5 lc rgb "royalblue" ps 1.2 pt 9 pi 1
set style line 3 lw 1.5 lc rgb "sea-green" ps 1.2 pt 28 pi 1
set style line 4 lw 1.5 lc rgb "orange" ps 1.2 pt 7 pi 1
set style line 5 lw 1.5 lc rgb "royalblue" ps 1.2 pt 9 pi 1
set style line 6 lw 1.5 lc rgb "sea-green" ps 1.2 pt 28 pi 1
set style line 7 lw 1.5 lc rgb "orange" ps 1.2 pt 7 pi 1
set style line 8 lw 1.5 lc rgb "royalblue" ps 1.2 pt 9 pi 1
set style line 9 lw 1.5 lc rgb "sea-green" ps 1.2 pt 28 pi 1
set style line 10 lw 1.5 lc rgb "#EE693F" ps 1.0 pt 5 pi 1
set style line 11 lw 1.5 lc rgb "#B166AE" ps 1.3 pt 15 pi 1

set output 'deuter_pepg_sn1.png'
set title "Order parameter sn1 POPE:POPG last 100 ns"
set key bottom left

plot "deuter_sn1_pepg_last100ns.svg" using ($1+1):($2) ls 1 title "0 peptides" ,\
      "deuter_sn1_pepg_1kom_last100ns_case2.svg" using ($1+1):($2) ls 2 title "1 peptide
case2",\
      "deuter_sn1_pepg_12kom_last100ns_case2.svg" using ($1+1):($2) ls 3 title "12
peptides case2",\
      "deuter_sn1_pepg_12kom_last100ns_CG2AA.svg" using ($1+1):($2) ls 10 title "12
peptides CG2AA",\
      "deuter_sn1_pepg_24kom_last100ns_CG2AA.svg" using ($1+1):($2) ls 11 title "24
peptides CG2AA",\
```



```

set output 'deuter_pope_sn1.png'
set title "Order parameter sn1 POPE last 100 ns"
set key bottom left

plot "deuter_sn1_pope_last100ns.xvg" using ($1+1):($2) ls 4 title "0 peptides",\
     "deuter_sn1_pope_1kom_last100ns_case2.xvg" using ($1+1):($2) ls 5 title "1 peptide
case2" ,\
     "deuter_sn1_pope_12kom_last100ns_case2.xvg" using ($1+1):($2) ls 6 title "12
peptides case2",\
     "deuter_sn1_pope_12kom_last100ns_CG2AA.xvg" using ($1+1):($2) ls 10 title "12
peptides CG2AA",\
     "deuter_sn1_pope_24kom_last100ns_CG2AA.xvg" using ($1+1):($2) ls 11 title "24
peptides CG2AA",\

set output 'deuter_popg_sn1.png'
set title "Order parameter sn1 POPG last 100 ns"
set key bottom left

plot "deuter_sn1_popg_last100ns.xvg" using ($1+1):($2) ls 7 title "0 peptides",\
     "deuter_sn1_popg_1kom_last100ns_case2.xvg" using ($1+1):($2) ls 8 title "1 peptide
case2",\
     "deuter_sn1_popg_12kom_last100ns_case2.xvg" using ($1+1):($2) ls 9 title "12
peptides case2",\
     "deuter_sn1_popg_12kom_last100ns_CG2AA.xvg" using ($1+1):($2) ls 10 title "12
peptides CG2AA",\
     "deuter_sn1_popg_24kom_last100ns_CG2AA.xvg" using ($1+1):($2) ls 11 title "24
peptides CG2AA",\

```

6. Clustsize

Primjer iz simulacije AA-12b POPE:POPG:

clustsize.sh:

```

#!/bin/bash
gmx clustsize -f noPBC_1000ns.xtc -s md10.tpr -n samo_peptidi.ndx -dt 0.5 -cut 0.35 -tu ns
-b 0 -e 1000
gmx xpm2ps -f csize.xpm -o csize.eps -di cluster.m2p
gnuplot gnuplot_clustersize

```

Gnuplot skripta gnuplot_clustsize:

```

set terminal png
set output 'nclust_dt_05ns.png'
set title "AA-12 POPE:POPG case2"

unset grid
set ylabel "Number of clusters"
set xlabel "Time ({/Symbol m}s)" enhanced

set border linewidth 2.0
#set xtics 20
#set ytics 0.2
#set mxtics 2
#set mytics 2

set xtics nomirror
set ytics nomirror

#set xtics format ""
#set ytics format ""
set key off
#set xrange [ 0 : 150]
set yrange [0 : 12]

```

```

set xtics font "Times-Roman, 20"
set ytics font "Times-Roman, 20"
set xlabel font "Times-Roman, 20"
set ylabel font "Times-Roman, 20"
set title font "Times-Roman, 20"
#set tics scale 2
#set size ratio 0.5

set colorsequence classic

plot "nclust_pepgl2_case2.xvg" using ($1/1000000):($2) with lines ls 1 lt rgb "dark-violet"
lw 2 title "Number of clusters",\
      "maxclust.xvg" using ($1/1000000):($2/347) with lines ls 1 lt rgb "forest-green" lw 2
title "Number of peptides in largest cluster",\

```

7. APL

Primjer iz simulacije AA-12b:

Gnuplot skripta gnuplot_apl:

```

set terminal png
set output 'apl.png'
set title "APL 12 peptides POPE:POPG case2"

unset grid
set ylabel "Area/lipid (nm^2)"
set xlabel "Time (ns)"
set y2label "Thickness (nm)"

set xtics nomirror
set ytics nomirror

set border linewidth 2.0
#set xtics 20
#set ytics 0.2
#set mxtics 2
#set mytics 2
set y2tics 1
set my2tics 2

#set xtics format ""
#set ytics format ""
set key bottom right font "Times-New-Roman, 12"
set xrange [ 0 : 1000]
set yrange [0.4 : 0.8]
set y2range [1:5]

set xtics font "Times-Roman, 20"
set ytics font "Times-Roman, 20"
set xlabel font "Times-Roman, 20"
set ylabel font "Times-Roman, 20"
set y2tics font "Times-Roman, 20"
set y2label font "Times-Roman, 20"
set title font "Times-Roman, 20"
#set tics scale 2
#set size ratio 0.5

set lmargin 10
set colorsequence classic

plot "apl_upside.xvg" using ($1/2):($2) axis x1y1 with lines ls 1 lt rgb "slategrey" lw 2
title "Upper leaflet",\
      "apl_downside.xvg" using ($1/2):($2) axis x1y1 with lines ls 1 lt rgb "plum" lw 2
title "Lower leaflet",\
      "thickness.xvg" using ($1/2):($2) axis x1y2 with lines ls 1 lt rgb "dark-turquoise"
lw 2 title "Thickness",\

```

8. Broj kontakata i minimalna udaljenost

Primjer iz simulacije kiadin-6 case2 DLPC:

numcont_mindist.sh:

```
#!/bin/bash
#Lizini su u kiadinu-6 na mjestima 1, 5, 8, 11, 15, 18
#Kreirati .ndx datoteku sa svakim od tih lizina kao posebnom grupom
printf "r LYS\n a P\n ri 1\n ri 5\n ri 8\n ri 11\n ri 15\n ri 18\n q\n" | gmx make_ndx -f
md0.gro -o index_P_lizini.ndx

#broj kontakata i mindist izmedju peptida i P atoma lipida
#Peptid je broj 1, P atomi broj 23
echo 23 1 | gmx mindist -group -f md_noPBC.xtc -n index_P_lizini.ndx -on
numcont_group_P_kiadin.xvg -od mindist_group_P_kiadin.xvg -b 0 -e 300 -tu ns

#broj kontakata i mindist izmedju pojedini lizina i P atoma lipida
#Grupa P je broj 23, Grupe lizina su 24 do 29
for i in 24 25 26 27 28 29
do
echo 23 $i | gmx mindist -f md_noPBC.xtc -n index_P_lizini.ndx -on numcont_P_LYS$i.xvg -od
mindist_P_LYS$i.xvg -b 0 -e 300 -tu ns
done

gnuplot gnuplot_numcont
gnuplot gnuplot_mindist
```

Gnuplot skripta gnuplot_numcont_group:

```
set terminal png
set output 'lizini_P_numcount_group.png'
set title "numcount group kiadin-6 case2 DLPC"

unset grid
set ylabel "numcont"
#set ylabel "mindist"
set xlabel "Time (ns)"

set border linewidth 2.0
set xtics 100
#set ytics 0.2
#set mxtics 2
#set mytics 2

set xtics border nomirror offset 0,-2.0
set ytics nomirror
set xtics font "Times-Roman, 22" offset 0,-0.2
#set format x ""

#set xtics format ""
#set ytics format ""
#set key left top
set key off
#set xrange [ 0 : 150]
set yrange [0 : 25]

set xtics font "Times-Roman, 20"
set ytics font "Times-Roman, 20"
set xlabel font "Times-Roman, 20"
set ylabel font "Times-Roman, 20"
set title font "Times-Roman, 20"
set tics scale 2
set size ratio 0.5

set tics front
set colorsequence classic
```

```

plot "numcount_group_P_LYS24.svg" using ($1):($2) with lines ls 1 lt 5 lw 1 title "LYS1",\
      "numcount_group_P_LYS25.svg" using ($1):($2) with lines ls 1 lt rgb "green" lw 1 title
"LYS4/LYS5",\
      "numcount_group_P_LYS26.svg" using ($1):($2) with lines ls 1 lt rgb "yellow" lw 1
title "LYS8",\
      "numcount_group_P_LYS27.svg" using ($1):($2) with lines ls 1 lt rgb "violet" lw 1
title "LYS11",\
      "numcount_group_P_LYS28.svg" using ($1):($2) with lines ls 1 lt 1 lw 1 title
"LYS14/LYS15",\
      "numcount_group_P_LYS29.svg" using ($1):($2) with lines ls 1 lt rgb "dark-blue" lw 1
title "LYS18/LYS19",\

```

9. Prosječan broj kontakata između pojedinačnih atoma lizina i membranskih P atoma usrednjeno tijekom zadnjih 100 ns simulacije

Primjer iz simulacije kiadin-6 case2 DLPC, uz pretpostavku da je već pozvan Gromacsov program *mindist* (iz prethodne točke), odnosno da već postoje datoteke `numcont_P_LYS$i.svg`.

`lizini_kontakti_zadnjih100ns.sh`:

```

#!/bin/bash
for i in 24 25 26 27 28 29
do
awk '/2\.000000e\+02/, EOF {print $2}' numcont_P_LYS$i.svg >
numcount_P_LYS_samodrugakolona$i.svg
awk '{total += $1 } END { print total/FNR }' numcount_P_LYS_samodrugakolona$i.svg >>
numcount_P_LYS_averages.svg
done

```

10. Izdvajanje gornjeg i donjeg sloja membrane u posebne grupe u .ndx datoteci

Korištena je Fatslim aplikacija [98].

1. Sve P atome iz oba membranska sloja staviti u jednu grupu u .ndx datoteci

```

gmx make_ndx -f step6.6_equilibration.gro -n index.ndx -o index.ndx
a P
name [broj grupe P] headgroups
q

```

2. Kreiranje `index_leaflet_0000.ndx` datoteke u kojoj će biti lipidi razdvojeni u dvije grupe (gornji i donji sloj)

```

fatslim membranes -c step6.6_equilibration.gro -n index.ndx --output-index
index_leaflet.ndx

```

11. Određivanje maksimuma z-koordinata od P atoma lipida tijekom simulacije

Također koristimo Fatslim aplikaciju. Uvjet za nastavak je postojanje dviju grupa u .ndx datoteci koje se odnose na gornji odnosno donji sloj membrane, kao što je opisano u prethodnoj proceduri 10. Pretpostavimo da su te grupe označene brojevima 0 i 1 u .ndx datoteci:

1. Iz svake grupe izdvojiti samo P atome

```
gmx make_ndx -f step6.6_equilibration.gro -n index_leaflet_0000.ndx -o
index_P.ndx
0 & a P
name [broj dobivene grupe] Pgornji
1 & a P
name [broj dobivene grupe] Pdonji
q
```

2. Kreiranje coord.svg datoteke u kojoj je prva kolona vrijeme, a ostale kolone (ima ih onoliko koliko lipida u jednom sloju) z visine P atoma

```
gmx trajectory -f noPBC_1000_nojump.xtc -s mdl1.tpr -n index_P.ndx -ox -z -b 0 -e 1000 -
tu ns
```

3. Pronalaženje maksimalne z-koordinate P atoma (izbrisati sve linije prije prvog retka u coord.svg, nazvati ga coord_za_awk.svg)

```
awk '{m=$2; for(i=2;i<=NF;i++) if($i>m) m=$i; print $1, m}' coord_za_awk.svg >
Pmaxz.svg
```

12. Jednostavno prebrojavanje lipida u slojevima pomoću tcl skripte

Otvoriti TkConsole u VMD-u. Pretpostavimo da je sredina membrane približno na koordinati $z=75$.

```
set gornjisloj [atomselect [molinfo top] {name P and resname POPC and z>75}]
set donjisloj [atomselect [molinfo top] {name P and resname POPC and z<75}]
$gornjisloj num
$donjisloj num
```

13. Podjela peptida (iz simulacija s većim brojem peptida, npr 12) u posebne mape i .pdb datoteke.

Spremiti koordinate svih peptida u posebnu datoteku **samopeptidi.pdb**

podjela_peptida.sh:

```
#!/bin/bash
for i in 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
do
mkdir peptid$i
done
#Jedan peptid ima 347 atoma
for i in 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
do
broj1=$((5+$i*347))
broj2=$((4+($i+1)*347))
broj3=$((($i+1))

awk 'NR>=1 && NR<=4 || NR>=$broj1'&& NR<=$broj2' || NR>=4169' samopeptidi.pdb >
./peptid$broj3/peptid$broj3.pdb

done
```