Załącznik 2PL

Autoreferat

dr Krzysztof Murzyn



Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, listopad 2016

Załącznik 2PL

Spis treści

1. Imię i nazwisko 1

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe 1

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych 2

4. Osiągnięcie naukowe 3

   4.a. Tytuł 3

   4.b. Wykaz prac stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego 3

   4.c. Omówienie celu naukowego, osiągniętych wyników oraz ich ewentualnego wykorzystania 4

   - Wprowadzenie 5
   - Wyniki i dyskusja 8

     1) Wpływ struktury chemicznej głów polarnych lipidów na oddziaływania cząsteczkowe w interfazie dwuwarstw zbudowanych z fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanoloaminy, fosfatydyloglicerolu i lipidu A 8

     2) Wpływ deuteracji wody na jej oddziaływania z lipidami w interfazie dwuwarstwy zbudowanej z fosfatydylocholiny 15

     3) Wpływ ustawień protokołu symulacyjnego oraz parametrów pola siłowego na własności interfazy dwuwarstw zbudowanych z fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanoloaminy, fosfatydyloglicerolu i lipidu A ... 20

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego 25

6. Omówienie osiągnięć organizacyjnych i dydaktycznych 28

1. **Imię i nazwisko:** Krzysztof Murzyn

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

   2.1. **Tytuł magistra**

   - **Data uzyskania**: 10. czerwca 1997 r.
   - **Tytuł pracy**: Struktura dynamiczna błony zbudowanej z 1-palmitoilo-2-elaidoilo-*sn*-glicerolo-3-fosfatydylocholiny (PEPC). Badania prowadzone metodą symulacji dynamiki molekularnej.
   - **Kierunek / specjalność**: Chemia / Chemia biologiczna
   - **Opiekun pracy**: Dr hab. Marta Pasenkiewicz-Gierula
   - **Jednostka przyznająca**: Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

   2.2. **Stopień doktora nauk biologicznych**

   - **Data uzyskania**: 22. lutego 2002 r.
   - **Tytuł pracy**: Molekularne mechanizmy działania i selektywności magaininy - badania metodą symulacji dynamiki molekularnej.
   - **Kierunek / specjalność**: Biotechnologia / Biofizyka
   - **Promotor**: Prof. dr hab. Marta Pasenkiewicz-Gierula
   - **Jednostka przyznająca**: Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
   - **Numer dyplomu**: D04013/33/02 (odpis jako **Załącznik 1**)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

od października 2013 do chwili obecnej	starszy wykładowca; Zakład Biofizyki Obliczeniowej i Bioinformatyki; Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii; Uniwersytet Jagielloński; Kraków
od lipca 2008 do sierpnia 2008	staż naukowy; University of Glasgow, Bioinformatics Research Centre, Glasgow, Wielka Brytania
od lutego 2008 do czerwca 2008	staż naukowy; University of Virginia, Department of Molecular Physiology and Biological Physics, Charlottesville, Virginia, Stany Zjednoczone Ameryki
lipiec 2005	staż naukowy; Helsinki University of Technology, Laboratory of Computational Engineering, Helsinki, Finlandia
od marca 2004 do września 2013	adiunkt; Zakład Biofizyki Obliczeniowej i Bioinformatyki; Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii; Uniwersytet Jagielloński; Kraków
od lutego 2002 do lutego 2004	asystent; Zakład Biofizyki Obliczeniowej i Bioinformatyki; Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii; Uniwersytet Jagielloński; Kraków

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

4.a. **Tytuł osiągnięcia naukowego**

Własności strukturalne i dynamiczne interfazy dwuwarstw zbudowanych z fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanoloaminy, fosfatydyloglicerolu i lipidu A

4.b. **Wykaz prac stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego** (autorzy, tytuł, data publikacji, dane bibliometryczne; podkreśleniem nazwiska habilitanta zaznaczono prace, w których jest autorem korespondującym)

Łączny wskaźnik oddziaływania (IF): **15.286**

Punktacja MNiSW (2015): **140**

Liczba cytowań
(WoS, listopad 2016): **177**
(bez autocytowań): **153**

h1. Róg T, **Murzyn K**, Pasenkiewicz-Gierula M (2003) Molecular dynamics simulations of charged and neutral lipid bilayers: treatment of electrostatic interactions. *Acta Biochim Polon* 50:789-798

IF (2003):	0.629
MNiSW (2015):	15
liczba cytowań [bez autocytowań]:	37 [32]

h2. **Murzyn K**, Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M (2005) Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane. *Biophys J* 88:1091-1103

IF (2005):	4.507
MNiSW (2015):	35
liczba cytowań [bez autocytowań]:	97 [93]

h3. Róg T, **Murzyn K**, Milhaud J, Karttunen M, Pasenkiewicz-Gierula M (2009) Water Isotope Effect on the Phosphatidylcholine Bilayer Properties: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J Chem Phys B* 113:2378-2387

IF (2009):	3.471
MNiSW (2015):	30
liczba cytowań [bez autocytowań]:	28 [20]

h4. **Murzyn K**, Bratek M, Pasenkiewicz-Gierula M (2013) Refined OPLS All-Atom Force Field Parameters for n-Pentadecane, Methyl Acetate, and Dimethyl Phosphate. *J Chem Phys B* 117:16388-16396

IF (2013):	3.377
MNiSW (2015):	30
liczba cytowań [bez autocytowań]:	12 [7]

h5. **Murzyn K**, Pasenkiewicz-Gierula M (2015) Structural Properties of the Water/Membrane Interface of a Bilayer Built of the *E. coli* Lipid A. *J Chem Phys B* 119:5846–5856

IF (2015):	3.302
MNiSW (2015):	30
liczba cytowań [bez autocytowań]:	3 [1]

4.c. Omówienie celu naukowego, osiągniętych wyników oraz ich ewentualnego wykorzystania

Moje zainteresowanie strukturą i dynamiką interfazy dwuwarstwy lipidowej ukształtowało się w czasie realizacji pracy magisterskiej a następnie doktorskiej. Ich tematyka dotyczyła, odpowiednio, własności mono-nienasyconych fosfatydylocholin oraz molekularnych podstaw działania peptydów selektywnie wiążących się z lipidami na powierzchni błon bakteryjnych. Przeprowadzenie tych badań pozwoliło mi gruntownie poznać rozmaite techniki wykorzystywane w badaniach prowadzonych metodą symulacji dynamiki molekularnej, a także zdobyć odpowiednie doświadczenie w interpretacji wyników analizy własności uwodnionych dwuwarstw lipidowych. W roku 2002 nasz zespół opublikował wstępne wyniki badań dynamiki wody w interfazie dwuwarstwy zbudowanej z fosfatydylocholiny (PC) **[1]**. Zidentyfikowanie licznych oddziaływań między cząsteczkami wody i fosfatydylocholiny oraz scharakteryzowanie wpływu głów polarnych lipidów na dynamikę oddziałujących z nimi cząsteczek wody zachęciło nas do bliższego przyjrzenia się własnościom strukturalnym i dynamicznym interfazy dwuwarstw zbudowanych z lipidów o różnej strukturze chemicznej głów polarnych. Spodziewaliśmy się, że badania interfazy dwuwarstw zbudowanych z lipidów bakteryjnych, takich jak: fosfatydyloetanoloamina (PE), fosfatydyloglicerol (PG) czy lipid A (LA) pozwolą nam w ciekawy sposób porównać ich własności z intensywnie ówcześnie badaną interfazą dwuwarstw zbudowanych z PC. Przeprowadzenie odpowiednich badań wymagało zbudowania i termicznego zrównoważenia w pełni uwodnionych dwuwarstw o różnym składzie lipidowym, ustalenia właściwych procedur obliczeniowych wykorzystywanych w prowadzeniu symulacji dynamiki molekularnej takich dwuwarstw oraz w analizie uzyskanych trajektorii atomowych, dokonaniu koniecznych poprawek i uzupełnień parametrów pól siłowych wykorzystywanych w opisie oddziaływań międzyatomowych w modelach komputerowych dwuwarstw lipidowych i wreszcie znalezieniu odpowiedzi na istotne pytania dotyczące interfazy. Do głównych osiągnięć naukowych wynikających z przeprowadzonych badań, których szczegóły opisane są pracach **[h1-h5]** wchodzących w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego (**Załącznik 4**), można zaliczyć:

[h1] wskazanie metody cząstka-sieć Ewalda jako tej, której zastosowanie w obliczeniach energii potencjalnej oddziaływań elektrostatycznych daje wiarygodne wyniki symulacji dynamiki molekularnej uwodnionych dwuwarstw lipidowych zbudowanych z lipidów, których głowa polarna obdarzona jest niezerowym ładunkiem elektrycznym

[h2] wyznaczenie własności strukturalnych i dynamicznych interfazy wewnętrznej błony bakterii Gram-ujemnych zbudowanej z fosfatydyloetanoloaminy i fosfatydyloglicerolu

[h3] scharakteryzowanie wpływu ciężkiej wody na oddziaływania między wodą i lipidami w interfazie dwuwarstw zbudowanych z fosfatydylocholiny

[h4] wyznaczenie nowych parametrów pola siłowego OPLS-AA wykorzystywanych przy parametryzacji głów polarnych i łańcuchów węglowodorowych lipidów

[h5] skonstruowanie komputerowego modelu dwuwarstwy zbudowanej z cząsteczek lipidu A z *Escherichia coli* oraz scharakteryzowanie własności strukturalnych i dynamicznych interfazy takiej dwuwarstwy

Dokładny opis indywidualnego wkładu habilitanta w przeprowadzenie tych badań zawarto w **Załączniku 4**. Poniżej zawarto krótkie wprowadzenie do struktury dwuwarstw lipidowych, biologicznego znaczenia różnic w strukturze chemicznej lipidów, ocenę stosowalności metody symulacji dynamiki molekularnej do badania dwuwarstw lipidowych oraz motywację prowadzenia takich badań. Wprowadzenie jest zakończone wskazaniem trzech zakresów badań, których wyniki zawarto w cyklu pięciu prac stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego.

WPROWADZENIE

Cząsteczki lipidów w środowisku wodnym wykazują zdolność tworzenia wielu rodzajów faz, w których są one rozmieszczone w taki sposób, że w zajmowanej przez nie przestrzeni można wyróżnić dobrze zdefiniowane części hydrofobowe i hydrofilowe o unikalnych własnościach i kształcie. Ten polimorfizm lipidów ma kluczowe znaczenie dla wielu procesów biologicznych zachodzących na poziomie komórkowym. Najpowszechniej występującą w przyrodzie fazą lipidową jest faza lamelarna, w której cząsteczki lipidów tworzą zamkniętą w przestrzeni dwuwarstwę cechującą się wyraźną anizotropią własności fizycznych wyznaczanych w płaszczyźnie oraz w poprzek dwuwarstwy. W obrębie dwuwarstwy lipidowej można wskazać jej hydrofobowe wnętrze zajmowane przez węglowodorowe fragmenty cząsteczek lipidów oraz interfazę, w której polarne fragmenty cząsteczek lipidów (tzw. głowy polarne) oddziałują z wodą, często w obecności jonów metali oraz aktywnych biologicznie cząsteczek. Organizacja zarówno hydrofobowego wnętrza dwuwarstwy jak i jej interfazy jest zależna m.in. od struktury chemicznej odpowiedniego fragmentu cząsteczki lipidu oraz temperatury. Zróżnicowanie w strukturze chemicznej zarówno węglowodorowego fragmentu cząsteczek lipidów jak i ich głów polarnych sprawia, że błony wielu komórek zawierają nawet setki różnego rodzaju lipidów, a skład cząsteczkowy takich błon często ulega modyfikacjom podążając za zmianami warunków środowiska.

Zróżnicowanie struktury chemicznej lipidów ma istotne znaczenie biologiczne **[2]**. Dzięki różnorodności lipidów, błona komórkowa może pozostawać w stanie ciekłokrystalicznym warunkującym m.in. prawidłowe funkcjonowanie białek błonowych, skuteczną kompartmentyzację procesów komórkowych oraz izolację komórki od otoczenia, którego

parametry (np. temperatura, stężenie jonów metali) mogą zmieniać się w szerokim zakresie. Specyficzne oddziaływania z udziałem lipidów mają istotne znaczenie dla prawidłowego przebiegu takich procesów, jak samoorganizacja i składanie kompleksów białek błonowych, tworzenie domen lipidowych, podziały i fuzjowanie komórek, pączkowanie i transport pęcherzykowy, itd. Warto zauważyć, że u podstaw selektywnego działania wielu antybiotyków peptydowych będących związkami błonowo czynnymi leżą specyficzne oddziaływania z głowami polarnymi lipidów tworzących błony bakteryjne **[3]**. Z kolei molekularny mechanizm działania pewnych anestetyków determinowany jest przez niespecyficzne oddziaływania tych związków z hydrofobowym wnętrzem błony **[4]**.

Metoda symulacji dynamiki molekularnej (SDM) **[5, 6]** jest jedną z nielicznych metod badawczych umożliwiających obecnie badanie struktury i dynamiki cząsteczek istotnych biologicznie w skali czasowej od piko- do mikrosekund. W metodzie SDM, układ badawczy reprezentowany jest przez cząsteczki zbudowane z atomów, których własności fizykochemiczne opisywane są przez szereg parametrów wyznaczanych niezależnie w badaniach eksperymentalnych i metodami chemii obliczeniowej. Oddziaływania między atomami w układzie cząsteczek opisywane są za pomocą tzw. funkcji potencjału, której wartości zależą od bieżącego położenia atomów. Funkcję potencjału wraz z zestawem parametrów opisujących oddziaływania międzyatomowe określa się jako tzw. pole siłowe. Znajomość potencjału w punkcie przestrzeni zajmowanym przez dowolny atom obdarzony określoną masą i ładunkiem pozwala wyznaczyć wypadkową siłę, jaka działa na niego w danej chwili, a więc także i przesunięcie w przestrzeni, jakiemu ten atom ulegnie w określonym krótkim odcinku czasu (tzw. krok czasowy symulacji wynosi zwykle ok. 2 fs). Sekwencja konfiguracji wszystkich atomów w układzie badawczym, tj. ich położenia w przestrzeni zapisane dla kolejnych kroków czasowych, nosi nazwę trajektorii. Analiza trajektorii rozpatrywanego układu badawczego pozwala wyznaczyć wiele jego własności fizycznych. Część z tych własności, które są znane z niezależnych badań, można bezpośrednio porównywać w celu tzw. walidacji modelu komputerowego, tj. weryfikacji jego fizycznej poprawności.

Jedną z zalet SDM, która przyczynia się do ciągłego wzrostu popularności tej metody w badaniach układów biocząsteczek, jest możliwość wyznaczenia na podstawie analizy ruchu cząsteczek zarówno własności fazowych, jak i cząsteczkowych układu modelowego. Porównanie tych pierwszych z danymi eksperymentalnymi pozwala zarówno na walidację modelu komputerowego, jak i weryfikację założeń leżących u podstaw modeli teoretycznych konstruowanych na potrzeby interpretacji mierzalnych eksperymentalnie własności fizykochemicznych. Dobrym przykładem komplementarności w zastosowaniu SDM i badań eksperymentalnych do badań strukturalnych dwuwarstw lipidowych jest wyznaczenie tzw. pola powierzchni na lipid (SA) w dwuwarstwie zbudowanej z dipalmitoilofosfatydylocholiny (DPPC) **[7]**. W opisywanych badaniach dwuwarstwy DPPC w fazie ciekłokrystalicznej w temperaturze 50°C, wartości SA uzyskane na podstawie interpretacji danych eksperymentalnych mieściły się w szerokim zakresie od 0.56 do 0.72 nm^2. Zastosowania SDM w celu wyznaczenia tego parametru pozwoliły zawęzić ten przedział do zakresu od 0.62 **[8]** do 0.645 nm^2 **[9]**, co bardzo dobrze odpowiada ostatecznie uznanej za poprawną, eksperymentalnie wyznaczonej wartości 0.635 nm^2 **[7]**. O ile w tym przypadku, badania eksperymentalne poprzedziły odpowiednie symulacje komputerowe, o tyle w badaniach dotyczących wpływu wody deuterowanej na własności interfazy dwuwarstwy zbudowanej z DPPC **[h3]** to właśnie wyniki symulacji dynamiki molekularnej zostały w pełni potwierdzone przez późniejsze badania eksperymentalne analogicznego układu modelowego **[10]**.

Stosowanie SDM w badaniach dwuwarstw lipidowych wiąże się z pewnymi ograniczeniami: (1) badane układy są zbudowane najczęściej z ograniczonej liczby cząsteczek lipidów oraz

odpowiedniej liczby cząsteczek wody, (2) czas pokryty w symulacjach zwykle nie przekracza dziesiątek/setek nanosekund. Zastosowanie periodycznych warunków brzegowych sprawia jednak, że nawet niewielka liczba uwodnionych cząsteczek lipidów może z powodzeniem reprezentować własności małego wycinka dwuwarstwy o ile czas pokryty w symulacjach jest wystarczający do reprezentatywnego próbkowania przestrzeni konformacyjnej i konfiguracyjnej oddziałujących ze sobą cząsteczek. Ocena kompletności próbkowania przestrzeni jest dokonywana przez porównanie własności fizycznych badanego układu wyznaczanych w kolejnych, niezachodzących na siebie odcinkach trajektorii lub w niezależnych symulacjach układów o takim samym składzie cząsteczkowym a różnej początkowej konfiguracji atomów i/lub ich początkowych prędkościach. Walidacja modelu komputerowego dwuwarstwy lipidowej nie obejmuje weryfikacji poprawności parametrów użytego pola siłowego oraz przyjętych ustawień protokołu obliczeniowego. Zakres stosowalności wybranych pól siłowych oraz ocenę poprawności doboru ustawień protokołu obliczeniowego ocenia się poprzez porównanie wyników badań takich samych lub podobnych modeli komputerowych uzyskanych w niezależnych symulacjach.

W pięciu publikacjach wchodzących w skład cyklu stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego podjąłem się scharakteryzowania dynamicznej struktury interfazy dwuwarstw o zróżnicowanym składzie lipidowym. Pojęcie "struktura dynamiczna" jest używane w publikacjach naszego zespołu badawczego w odniesieniu do konformacji wyróżnionych części cząsteczek (w szczególności: głów polarnych lipidów) oraz oddziaływań, w których te części cząsteczek biorą udział. Zarówno konformacje, jak i oddziaływania cechują się właściwą sobie dynamiką, wyrażającą się między innymi w przejściach konformacyjnych fragmentów cząsteczek oraz procesach ciągłego tworzenia i zrywania określonych oddziaływań. Głównym celem opisanych poniżej badań było scharakteryzowanie, jaki wpływ na strukturę i dynamikę interfazy dwuwarstwy ma struktura chemiczna głów polarnych wybranych lipidów oraz deuteracja wody. W badaniach, których wyniki są zawarte w pięciu pracach cyklu stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego, przeprowadzono analizy w pełni uwodnionych dwuwarstw lipidowych zbudowanych z PC, PE, PG oraz LA.

W kolejnych częściach tego autoreferatu, przedstawione są najważniejsze wyniki rozprawy habilitacyjnej, w szczególności te dotyczące:

1. **wpływu struktury chemicznej głów polarnych lipidów na oddziaływania cząsteczkowe w interfazie dwuwarstw zbudowanych z PC, PE, PG i LA,**

2. **znaczenia obecności ciężkiej wody na oddziaływania między wodą a lipidami w interfazie dwuwarstwy zbudowanej z PC;**

3. **wpływu wyboru ustawień protokołu obliczeniowego oraz parametrów pola siłowego na własności interfazy dwuwarstw zbudowanych z PC, PE, PG i LA.**

WYNIKI i DYSKUSJA

1. Wpływ struktury chemicznej głów polarnych lipidów na oddziaływania cząsteczkowe w interfazie dwuwarstw zbudowanych z fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanoloaminy, fosfatydyloglicerolu i lipidu A.

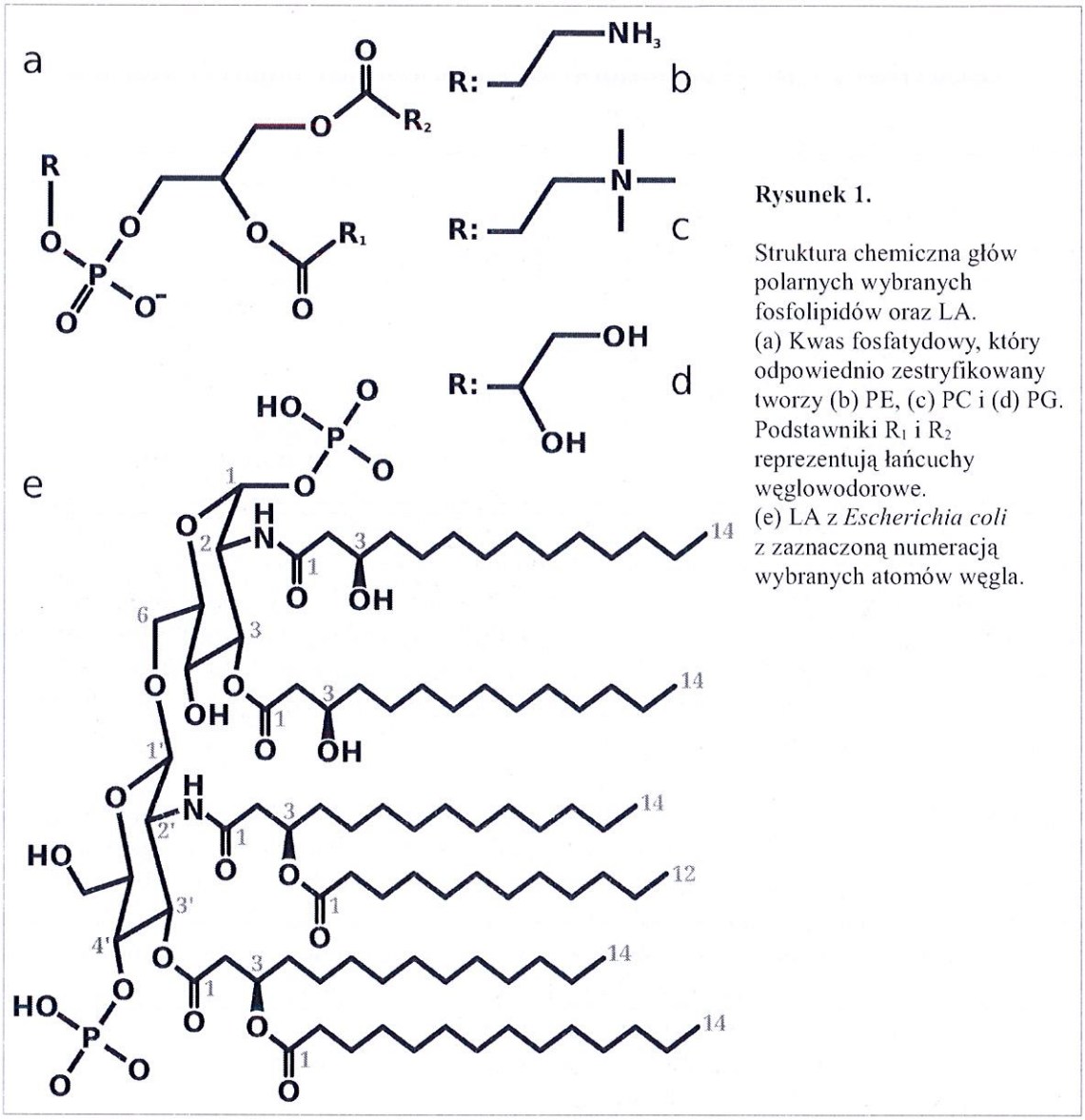
PC i PE są głównymi składnikami lipidowymi błon komórkowych ssaków. Zawartość PC / PE w błonach komórek ssaków mieści się w zakresie od 31% / 10% (ludzkie erytrocyty) do 60% / 26% (wątroba szczura) **[11]**. U bakterii to PE jest głównym składnikiem lipidowym błony cytoplazmatycznej. PC nie występuje u 90% gatunków bakterii (np. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) **[12]**, jednak w nielicznych przypadkach jest głównym składnikiem lipidowym wewnętrznej błony bakteryjnej (*Acetobacter aceti*, 73% **[13]**). U większości bakterii Gram-ujemnych, PE stanowią do 80% cząsteczek lipidów błony wewnętrznej oraz wewnętrznego listka błony zewnętrznej. Udział PG w tych błonach szacowany jest na 15-25% **[14]**. Zewnętrzny listek błony bakterii Gram-ujemnych zbudowany jest lipopolisacharydu (LPS): cząsteczki lipidu o złożonej strukturze chemicznej, w której można wyróżnić wysoce zmienny łańcuch polisacharydowy (tzw. łańcuch O-swoisty), LA kotwiczący LPS w błonie oraz względnie niewielki fragment oligosacharydowy (tzw. część rdzeniową), który łączy LA z łańcuchem O-swoistym. LA w znakomitej większości występuje w zewnętrznej błonie bakterii Gram-ujemnych jako fragment LPS. Wyjątkiem wartym odnotowania jest *Francisella tularensis*, której zewnętrzny listek błony zewnętrznej w 95% zawiera LA, a nie LPS **[15]**. Struktury chemiczne głów polarnych PE, PG, PC oraz LA przedstawiono na Rysunku 1.

Wspólnym elementem strukturalnym głów polarnych PE, PG oraz PC jest kwas fosfatydowy (por. Rys. 1a) z tzw. szkieletem glicerolowym. Do szkieletu glicerolowego w pozycjach 2 i 3 przyłączone są dwie grupy acylowe. W ww. lipidach, alkoholem estryfikującym grupę fosforanową jest, odpowiednio, etanoloamina, glicerol oraz cholina (Rys. 1bcd). PE i PC przy pH ok. 7 są jonami obojnaczymi z sumarycznym ładunkiem całej cząsteczki lipidu równym zero. PG przy tym pH obdarzony jest ładunkiem -1*e*. Głowa polarna LA w LPS *Escherichia coli* zawiera dwie reszty glukozaminy połączone wiązaniem β1→6 glikozydowym (Rys. 1e). W pozycjach 1 i 4', reszty glukozaminy LA są zestryfikowane grupami fosforanowymi. Przy pH ok. 7, LA obdarzony jest ładunkiem -2*e*.

Najpowszechniej występującymi oddziaływaniami cząsteczkowymi w interfazie dwuwarstw lipidowych są wiązania wodorowe, pomosty wodne, pary ładunkowe oraz mostki jonowe. Na Rysunku 2 zilustrowano każdy z tych typów oddziaływań w dwuwarstwach o różnym składzie lipidowym. Warto zauważyć, że każde z tych oddziaływań może być zarówno wewnątrz- jak i międzycząsteczkowe a interfazowe oddziaływania lipidów determinują tworzenie rozległych sieci oddziałujących ze sobą cząsteczek **[16]**. Czasy życia oddziaływań lipidów w interfazie mieszczą się zwykle w przedziale od kilku do kilkudziesięciu pikosekund, co sprawia, że mogą być one z powodzeniem badane metodą symulacji dynamiki molekularnej.

W naszych publikacjach **[h5, h3, h2, h1]** scharakteryzowaliśmy oddziaływania z udziałem lipidów, wody i jonów metali w interfazie dwuwarstw o różnym składzie lipidowym. Oddziaływania między lipidami wpływają na kolektywną dynamikę lipidów w dwuwarstwie, stabilizują jej strukturę oraz są odpowiedzialne za rozpoznawanie cząsteczkowe determinujące specyficzne działanie wielu związków błonowo czynnych (por. oddziaływania LA i polimyksyny B **[17]**, magaininy i cholesterolu **[3, 18]**, itp.). Dzięki wysokiej rozdzielczości czasowej i przestrzennej symulacji dynamiki molekularnej, nasz zespół mógł

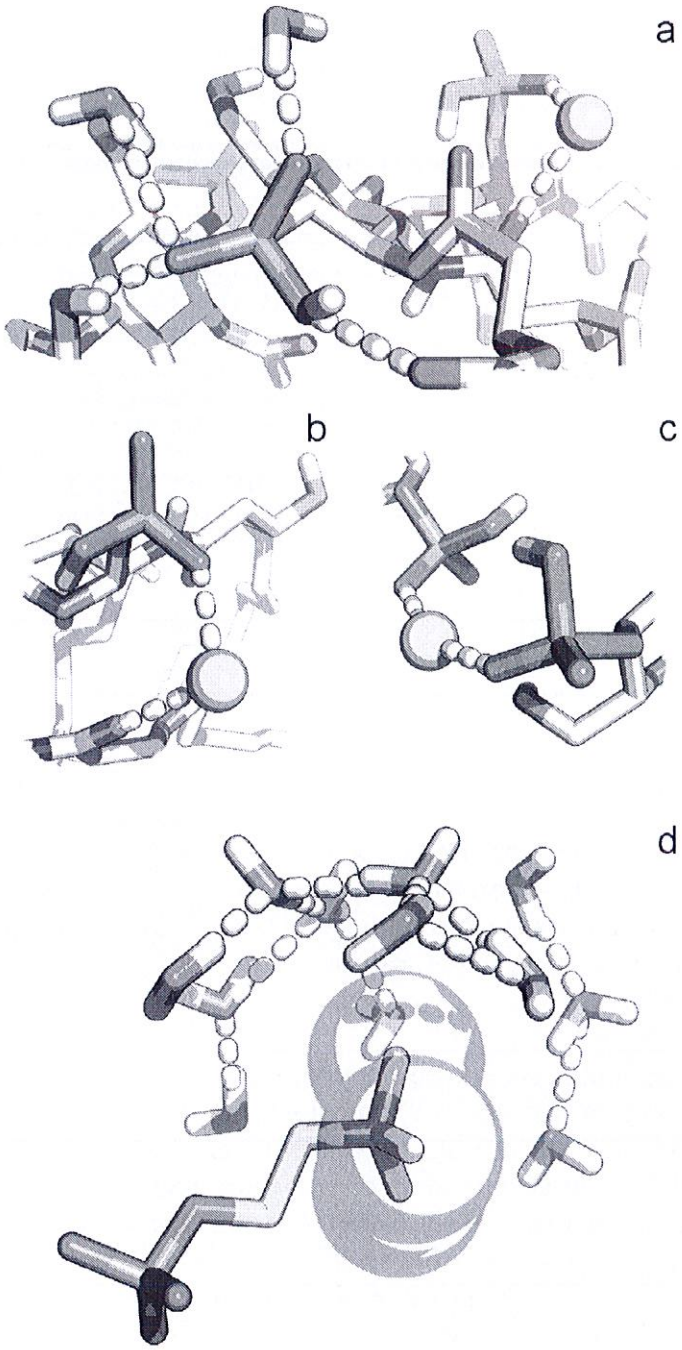
z powodzeniem wykorzystać tę metodę badawczą w analizie oddziaływań różnego typu między cząsteczkami lipidów w dwuwarstwie.



Rysunek 1.

Struktura chemiczna głów polarnych wybranych fosfolipidów oraz LA. (a) Kwas fosfatydowy, który odpowiednio zestryfikowany tworzy (b) PE, (c) PC i (d) PG. Podstawniki R_1 i R_2 reprezentują łańcuchy węglowodorowe. (e) LA z *Escherichia coli* z zaznaczoną numeracją wybranych atomów węgla.

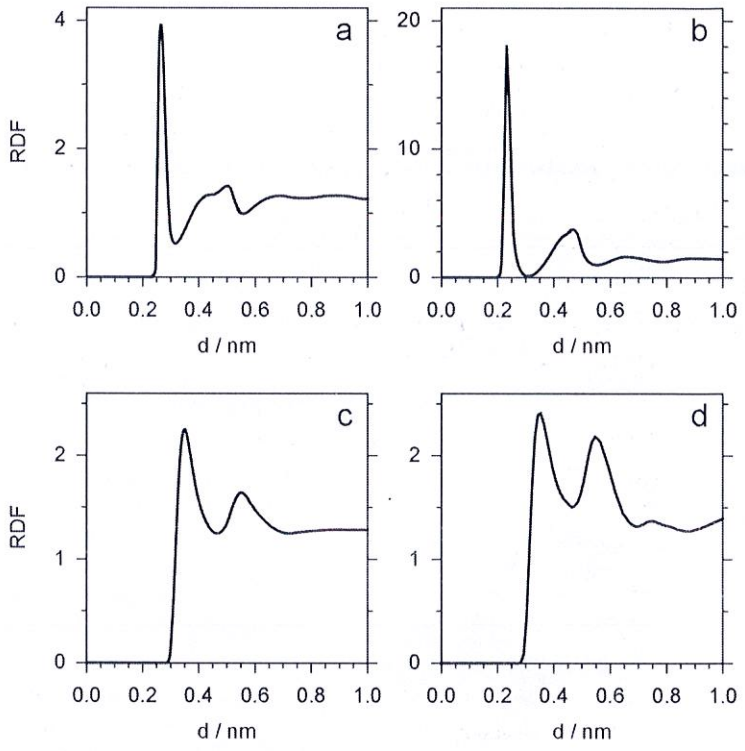
Oddziaływania międzycząsteczkowe mogą być identyfikowane na podstawie niezależnie zdefiniowanych kryteriów geometrycznych. Cennym źródłem informacji o lokalnej konfiguracji oddziałujących ze sobą fragmentów cząsteczek są funkcje rozkładu radialnego (Rysunek 3, RDFs, ang. *Radial Distribution Functions*). Położenie pierwszego minimum na wykresach tych funkcji było przez nasz zespół wykorzystywane do zdefiniowania kryteriów odległościowych przy identyfikacji wiązań wodorowych (Rys. 3a), mostków jonowych (Rys. 3b) i wody klatratowej (Rys. 3c). W przypadku par ładunkowych, pierwsze minimum RDF widoczne jest dla odległości ok. 0.46 nm (Rys. 3d). W badaniach naszego zespołu, w przypadku par ładunkowych, wykorzystaliśmy ostatecznie kryterium odległości 0.4 nm, które wcześniej zostało przyjęte przy okazji identyfikowania mostków solnych w białkach **[19]**. W rozważanych przypadkach, RDFs przyjmują wartości bliskie 1 dla odległości między oddziałującymi atomami w przedziale od 1.5 do 2.0 nm. W tym przedziale odległości można zatem spodziewać się zaniku porządkującego wpływu występowania określonych oddziaływań międzycząsteczkowych na strukturę interfazy.



Rysunek 2.

Przykłady oddziaływań w interfazie dwuwarstwy lipidowej. (a) Wiązania wodorowe między wodą a cząsteczką LA oraz w cząsteczce LA. (b, c) Mostek jonowy w cząsteczce LA, w którym jon sodu (sfera w kolorze cyjanowym) jest jednocześnie związany przez dwie grupy funkcyjne tej samej lub różnych cząsteczek lipidu), (d) Woda klatratowa w otoczeniu grupy cholinowej PC.

Wiązania wodorowe są jednymi z najczęściej występujących oddziaływań w interfazie dwuwarstwy. Cząsteczki lipidów tworzą wiązania wodorowe z cząsteczkami wody lub między sobą (Rys. 2a). W naszych badaniach uznajemy, że wiązanie wodorowe zostało utworzone jeśli odległość d_{DA} między donorem (D) wodoru (H) i jego akceptorem (A) wynosi co najwyżej 0.325 nm (por. Rys. 3a) a wartość kąta α_{HDA} między dwoma wektorami $\vec{DH}$ i $\vec{DA}$ nie przekracza 35° **[20]**. Pomosty wodne między cząsteczkami lipidów w dwuwarstwie są tworzone w przypadkach, kiedy ta sama cząsteczka wody jest związana wodorowo przez co najmniej dwie różne cząsteczki lipidów. Warto zauważyć, że struktura chemiczna niektórych lipidów umożliwia tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych i pomostów wodnych.



Rysunek 3.

Funkcja rozkładu radialnego (RDF) dla wybranych oddziaływań z udziałem wody, jonów sodu i PC. (a) wiązania wodorowe między atomami tlenu grupy fosforanowej PC i wodą (**[h3]**, Rys. 6b), (b) mostek jonowy tworzony z udziałem jonów sodu oraz atomów tlenu grup fosforanowych dwóch cząsteczek PC (**[h2]**, Rys. 7a) (c) woda klatratowa w otoczeniu grupy cholinowej PC (**[h3]**, Rys. 6a), (d) pary ładunkowe tworzone przez dwie cząsteczki lipidów (**[21]**, Rys. 4a po znormalizowaniu),

Mostki jonowe (Rys. 2bc) między cząsteczkami lipidów w dwuwarstwie są tworzone w przypadkach, kiedy ten sam jon jest w bezpośrednim kontakcie z co najmniej dwoma atomami różnych cząsteczek lipidów. Analiza odpowiedniej RDF (Rys. 3b) wskazuje, że jon sodu pozostaje w kontakcie z atomami tlenu lipidu jeśli odległość między jonem i atomem nie przekracza 0.31 nm.

W pierwszej strefie hydratacyjnej grupy cholinowej, cząsteczki tzw. wody klatratowej są uporządkowane w charakterystyczny sposób (Rys. 2d) umożliwiający tworzenie między nimi wiązań wodorowych, których oś jest styczna do powierzchni cząsteczkowej tej grupy. Analiza odpowiedniej RDF (Rys. 3c) wskazuje, że przy tworzeniu tego typu oddziaływań w dwuwarstwie, odległość między atomami tlenu wody i azotu grupy cholinowej nie przekracza 0.475 nm. Spośród cząsteczek wody, które spełniają to kryterium wyłączane są te cząsteczki wody, które tworzą wiązania wodorowe z atomami rozpatrywanej cząsteczki lipidu. W innych naszych badaniach **[h3]** (por. p-kt 3 tej części autoreferatu) wykazaliśmy, że wyraźna większość cząsteczek wody klatratowej zaangażowana jest jednocześnie w tworzenie wiązań wodorowych z atomami tlenu grup fosforanowych innych cząsteczek lipidów w ich bezpośrednim sąsiedztwie. Ten podzbiór cząsteczek wody klatratowej nazywamy wodą kotwiczącą.

Pary ładunkowe są tworzone przez cząsteczki lipidów, których głowa polarna zawiera odmiennie naładowane grupy funkcyjne (np. grupę cholinową i fosforanową w cząsteczce fosfatydylocholiny) przy czym co najmniej jedna z nich jest niezdolna do tworzenia wiązań wodorowych (np. grupa cholinowa). W naszych badaniach, w celu identyfikacji par ładunkowych wykorzystywane jest kryterium geometryczne, zgodnie z którym uznaje się, że para ładunkowa jest utworzona jeśli odległość między wyróżnionymi atomami dwóch odmiennie naładowanych grup funkcyjnych głowy polarnej lipidu nie przekracza pewnej granicznej wartości; np. przy identyfikacji par ładunkowych tworzonych przez grupę cholinową i grupę fosforanową w cząsteczkach fosfatydylocholiny brana jest pod uwagę odległość między atomami tlenu grupy fosforanowej oraz węgla grup metylowych w grupie cholinowej $d_{CP} < 0.4$ nm (por. Rys. 3d).

W publikacjach naszego zespołu **[h1, h2, h5]** zawarliśmy wyniki nanosekundowych symulacji dynamiki molekularnej uwodnionych dwuwarstw zbudowanych z PC, PE i PG oraz LA o strukturze chemicznej właściwej *Escherichia coli*. W latach poprzedzających opublikowanie wyników naszych badań, oddziaływania między lipidami w interfazie były analizowane w większości dla dwuwarstw zbudowanych z PC. Nasz zespół rozszerzył te badania na dwuwarstwy zbudowane z lipidów bakteryjnych (tj. PE, PG i LA). W Tabeli 1 zebrano dane dotyczące liczebności i rodzaju oddziaływań w interfazie dwuwarstw o zróżnicowanym składzie lipidowym (PC **[h1]**, PE, PG i PC **[h2]**, LA **[h5]**).

W ciekłokrystalicznej dwuwarstwie lipidowej, jedna cząsteczka fosfolipidu (PE, PG, PC) tworzy średnio ok. 6 wiązań wodorowych z wodą. Liczba wiązań wodorowych między wodą a cząsteczką LA z *E. coli* jest niemal trzykrotnie większa. W głowie polarnej PC, wiązania wodorowe z wodą tworzone są głównie przez atomy tlenu grupy fosforanowej i grup karbonylowych **[h2]**. Cząsteczki PE i PG uczestniczą w większej liczbie wiązań wodorowych z wodą dzięki obecności w ich głowach polarnych dodatkowych grup atomów będących donorami lub akceptorami wiązań wodorowych. Łącznie w wiązaniach wodorowych z wodą uczestniczy od 8 (PC) do 10 (PG) atomów lipidów będących donorami lub akceptorami wiązań wodorowych. W cząsteczce LA takich atomów jest 27.

Dzięki obecnym w cząsteczkach PE, PG i LA dodatkowym grupom atomów będących donorami lub akceptorami wiązań wodorowych, lipidy te mogą tworzyć wiązania wodorowe z innymi lipidami w dwuwarstwie. Liczba takich międzycząsteczkowych wiązań wodorowych mieści się w zakresie od 1.07 (PE) do 2.7 (LA). W dwuwarstwie zbudowanej wyłącznie z cząsteczek PC, tworzenie wiązań wodorowych między lipidami nie jest możliwe. Zdolność tworzenia wiązań wodorowych między cząsteczkami lipidów przekłada się na większą liczbę tworzonych pomostów wodnych między takimi lipidami. PE i PG tworzą średnio trzy razy więcej pomostów wodnych niż PC. Obecność grupy cholinowej w cząsteczce PC sprawia jednak, że liczba cząsteczek wody oddziałujących bezpośrednio z cząsteczką lipidu w dwuwarstwie jest znacznie większa niż w przypadku PE i PG. Co więcej, niemal 60% **[h3]** spośród ~6 cząsteczek tworzących pierwszą strefę hydratacyjną grupy cholinowej (tzw. wody klatratowej) cząsteczki PC jest związanych wodorowo z atomami tlenu grup fosforanowych i karbonylowych sąsiadujących z nią cząsteczek lipidów. Obecność w interfazie cząsteczek wody klatratowej zaangażowanych w tworzenie wiązań wodorowych z innymi lipidami (czyli tzw. wody kotwiczącej) zostało opisane przez nasz zespół po raz pierwszy. Obecność cząsteczek wody kotwiczącej w interfazie dwuwarstw zbudowanych z PC umożliwia tworzenie rozległych połączeń między cząsteczkami lipidów i częściowo kompensuje brak możliwości bezpośrednich wiązań wodorowych między lipidami. Z kolei w przypadku dwuwarstw zawierających ujemnie naładowane lipidy (tu: PG i LA) istotny wkład w stabilizowanie oddziaływań między lipidami w interfazie mają mostki jonowe. Tworzenie takich mostków zaobserwowaliśmy w trakcie badań dwuwarstwy PE / PG **[h1, h2]**, jednak przeprowadzone przez nas symulacje były zbyt krótkie aby opisać ilościowo ten typ oddziaływań. W jednej z ostatnio opublikowanych prac **[h5]** ustaliliśmy, że każda cząsteczka LA w dwuwarstwie tworzy średnio 1.27 mostków z udziałem jonów sodu. Zatem bezpośrednich wiązań wodorowych między lipidami jest zaledwie dwukrotnie więcej niż międzylipidowych mostków jonowych.

	PE	PG	PC	LA
wiązania wodorowe między lipidem a wodą	6.57	6.11	5.50	17.90
mostki wodne między lipidami	1.59	2.19	0.60	NW
wiązania wodorowe między lipidami	1.07	1.30	0.0	2.70
pary ładunkowe między lipidami	0.0	0.0	1.70	0.0
cząsteczki wody w powłoce hydratacyjnej grupy cholinowej	0.0	0.0	6.40	0.0

Tabela 1. Liczebność poszczególnych rodzajów oddziaływań międzycząsteczkowych w interfazie dwuwarstw lipidowych w fazie ciekłokrystalicznej, które są zbudowane z PE i PG, PC oraz LA. Dane na podstawie **[h1, h2, h5]**. NW: nie wyznaczano. Błąd wartości średnich: < 2%.

Oddziaływania między lipidami w interfazie dwuwarstwy lipidowej mają duży wpływ na własności całej dwuwarstwy. Dwuwarstwa zbudowana z LA charakteryzuje się największą liczbą tworzonych przez lipidy wiązań wodorowych. Konsekwencje intensywnych oddziaływań między głowami polarnymi lipidów w tej dwuwarstwie widoczne są w odpowiednich profilach gęstości elektronowej **[h5]**. W porównaniu z dwuwarstwami zbudowanymi z PE i PG, dwuwarstwa LA w stanie ciekłokrystalicznym ma bardziej zwartą strukturę (pole powierzchni na łańcuch acylowy jest niższe) i jest płycej penetrowana przez wodę i jony sodu. Jak wskazują doświadczenia naszego zespołu, balans oddziaływań w interfazie może być łatwo zaburzony: niedostatki w parametryzacji grupy fosforanowej przejawiające się w przeszacowywaniu energii oddziaływań międzycząsteczkowych skutkują w niepoprawnym odtwarzaniu stanu fazowego dwuwarstwy (por. p-kt 4 tej części autoreferatu).

Nasze badania pozwoliły uzyskać wgląd w rolę PG w dwuwarstwach zawierających PE. Oba rodzaje lipidów tworzą wewnętrzną błonę bakterii Gram-ujemnych. PE wykazuje skłonność do tworzenia faz nielamelarnych we względnie niskich temperaturach, a obecność rozpuszczalników organicznych obniża temperaturę przejścia fazowego między odwróconą fazą heksagonalną i fazą lamelarną **[22]**. Włączenie do dwuwarstwy PE cząsteczek PG stabilizuje fazę lamelarną i uznawane jest za jeden z mechanizmów adaptacyjnych u bakterii opornych na rozpuszczalniki organiczne **[14]**. U molekularnych podstaw tej stabilizacji leżą specyficzne oddziaływania między PE i PG. Nasze badania wskazują, że w takiej dwuskładnikowej dwuwarstwie preferowane są heterogeniczne kontakty międzycząsteczkowe, tj. PE oddziałuje częściej z PG niż z PE a PG oddziałuje częściej z PE niż z PG. Wynik ten potwierdza wcześniejsze wnioski wypływające z badań kalorymetrycznych **[23]**. Istotną rolę PG w stabilizowaniu fazy lamelarnej odgrywają tworzone z ich udziałem pomosty wodne i mostki jonowe. Podobnie jak w przypadku dwuwarstw zbudowanych z LA, występowanie licznych oddziaływań w interfazie dwuwarstwy przejawia się w większej zwartości dwuwarstwy, szczególnie blisko jej powierzchni.

Wspólną cechą oddziaływań różnych głów polarnych lipidów jest dominująca rola w tych oddziaływaniach grup fosforanowych. Niezależnie od struktury chemicznej głowy polarnej, atomy tlenu tej grupy najliczniej tworzą wiązania wodorowe z wodą i jeśli to możliwe

z innymi cząsteczkami lipidów. Niezależnie od rodzaju lipidu, atomy tlenu uczestniczące w wiązaniach estrowych mają marginalnie niski wkład w oddziaływania międzycząsteczkowe, co zapewne wynika z ich ograniczonej ekspozycji na oddziaływania z wodą.

W naszych wcześniejszych badaniach **[16]** wskazaliśmy na istnienie korelacji między polem powierzchni zajmowanym przez cząsteczkę lipidu w dwuwarstwie a liczbą oddziaływań interfazowych, jakie ta cząsteczka tworzy. Mimo, że badane przez nas fosfolipidy **[h1]** charakteryzują się bardzo zbliżonymi wartościami pola powierzchni na lipid w odpowiednich dwuwarstwach (tj. 0.61 (POPE), 0.628 (POPG) oraz 0.635 nm^2 (POPC) **[h1]**; dla porównania, wartości pola powierzchni na lipid z najnowszych badań eksperymentalnych wynosza odpowiednio 0.59, 0.661 i 0.655 nm^2), to jednak w dwuwarstwach lipidowych zbudowanych z PC oraz PE i PG obserwujemy wyraźnie odmienny wzorzec oddziaływań interfazowych z różnicami widocznymi zarówno w typach oddziaływań jak i ich liczebności.

Podsumowanie

Wyniki uzyskane przez nasz zespół wskazują, że struktura chemiczna głów polarnych ma istotne znaczenie dla rodzaju i liczebności oddziaływań międzycząsteczkowych w interfazie dwuwarstw lipidowych. Głowy polarne różnych lipidów mają zazwyczaj różną liczbę i rozmieszczenie grup funkcyjnych, których charakter chemiczny decyduje o rodzaju tworzonych przez nie oddziaływań międzycząsteczkowych. Z tego powodu, kluczową rolę w kreowaniu własności interfazy dwuwarstwy pełnią grupy atomów wykazujące zdolność tworzenia wiązań wodorowych oraz kierunkowych oddziaływań elektrostatycznych (tj. par ładunkowych). Woda pełni aktywną rolę w oddziaływaniach między lipidami dzięki tworzeniu pomostów wodnych oraz przyjmowaniu klatratowej konfiguracji wokół dodatnio naładowanych grup pozbawionych zdolności tworzenia wiązań wodorowych (np. grupy cholinowej). Większość cząsteczek wody klatratowej, tzw. woda kotwicząca, zaangażowana jest w tworzenie wiązań wodorowych z innymi cząsteczkami lipidów, co w przypadku PC kompensuje brak możliwości tworzenia przez te lipidy bezpośrednich wiązań wodorowych. Dzięki obecności naładowanych elektrycznie grup atomów w głowach polarnych lipidów możliwe jest tworzenie między nimi mostków jonowych. Szeroki repertuar możliwych oddziaływań między głowami polarnymi lipidów pozwala na tworzenie rozległych sieci połączeń międzycząsteczkowych zapewniających integralność powierzchni dwuwarstwy i stabilizujących jej lamelarną strukturę.

Wyniki opisane w tej części autoreferatu zostały opublikowane w następujących trzech pracach wchodzących w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego:

[h1] Róg T, **Murzyn K**, Pasenkiewicz-Gierula M (2003) Molecular dynamics simulations of charged and neutral lipid bilayers: treatment of electrostatic interactions. *Acta Biochim Polon* 50:789-798

[h2] **Murzyn K**, Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M (2005) Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane *Biophys J* 88:1091-1103

[h5] **Murzyn K**, Pasenkiewicz-Gierula M (2015) Structural Properties of the Water/Membrane Interface of a Bilayer Built of the *E. coli* Lipid A. *J Phys Chem B* 119:5846–5856

2. Wpływ deuteracji wody na jej oddziaływania z lipidami w interfazie dwuwarstwy zbudowanej z fosfatydylocholiny.

Ciężka woda (D_2O) stanowi zaledwie 0.0155% wody na Ziemi. Zamiana wodoru na deuter w cząsteczce wody ma względnie niewielki wpływ na jej własności fizykochemiczne (por. Tabela 2).

	Woda lekka H_2O	Woda ciężka D_2O
ciepło parowania [kJ/mol]	45.051	45.988
moment dipolowy [D]	1.85	1.87
temperatura wrzenia [°C]	100	101.2
temperatura topnienia [°C]	0.0	3.8
gęstość w war. stand. [g/L]	0.997	1.104
lepkość w war. stand. [mPa·s]	1.00	1.25

Tabela 2. Wybrane własności fizykochemiczne wody lekkiej i ciężkiej **[24]**.

W badaniach układów cząsteczek o znaczeniu biologicznym istotne okazują się różnice we własnościach spektroskopowych wodoru i deuteru (np. w spektroskopii w podczerwieni wykorzystywane jest przesunięcie widma absorpcji drgań wiązań z udziałem wodoru lub deuteru zaangażowanych w tworzenie wiązań wodorowych; w spektroskopii rozpraszania neutronowego kluczowe znaczenie mają różne długości rozpraszania wodoru i deuteru; w spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego różnice w częstościach rezonansowych wodoru i deuteru umożliwiają stabilizację natężenia pola magnetycznego w trakcie pomiarów uwodnionych układów modelowych oraz usunięcie z rejestrowanego widma sygnałów absorpcyjnych rozpuszczalnika).

W stężeniach przekraczających 20% ciężka woda może być toksyczna dla zwierząt **[25]**. Wpływ ciężkiej wody na biocząsteczki przejawia się m.in. poprzez tworzenie bardziej trwałych wiązań wodorowych między cząsteczkami wody i biocząsteczkami oraz szybką wymianą wodoru na deuter w biocząsteczkach, co z kolei może prowadzić do zaniku ich aktywności biologicznej. Cząsteczki białek pod wpływem kontaktu z ciężką wodą przyjmują bardziej zwartą konformację z mniejszą powierzchnią dostępności rozpuszczalnika **[26]** co może mieć znaczenie w procesach polimeryzacji i agregacji pewnych białek **[27]**. Białka w obecności ciężkiej wody przyjmują bardziej stabilne konformacje co przejawia się we wzroście liczby wewnątrzbiałkowych wiązań wodorowych **[28]**. Takie zmiany w ruchliwości konformacyjnej białek wykazujących aktywność enzymatyczną mogą przekładać się na wyraźne zwolnienie katalizowanych przez nie reakcji biochemicznych. Chociaż wyniki badań dotyczących wpływu ciężkiej wody na strukturę i dynamikę białek są względnie liczne, to jednak niewiele wiadomo na temat takiego wpływu na dwuwarstwy lipidowe. Wpływ ciężkiej wody na strukturę i własności dwuwarstw lipidowych przejawia się

w zmniejszeniu pola powierzchni na lipid **[29]** oraz towarzyszącymi mu zwiększeniem uporządkowania łańcuchów węglowodorowych lipidów w dwuwarstwie i zmniejszoną głębokością penetracji wnętrza dwuwarstwy przez cząsteczki wody **[30]**.

W publikacji naszego zespołu **[h3]** opisano wyniki dwóch porównawczych 50 ns symulacji dynamiki molekularnej dwuwarstw lipidowych zbudowanych z DPPC uwodnionych wodą lekką i ciężką. Przeprowadzone badania umożliwiły scharakteryzowanie wpływu ciężkiej wody na własności zarówno interfazy dwuwarstwy, jak i jej hydrofobowego wnętrza. W tej pracy szczegółowej analizie poddano wpływ ciężkiej wody na oddziaływania między lipidami oraz między lipidami i wodą. Istotnym wynikiem tej pracy było również scharakteryzowanie własności cząsteczek wody lekkiej i ciężkiej w interfazie. W ocenie znaczenia wyników zawartych w tej pracy dla lepszego poznania wpływu ciężkiej wody na własności interfazy dwuwarstw lipidowych warto przywołać publikację Baranovej i wsp. **[10]**, w której uzyskane przez nasz zespół wyniki zostały w pełni potwierdzone badaniami eksperymentalnymi.

Przeprowadzone symulacje dynamiki molekularnej wskazują, że wpływ ciężkiej wody na strukturę dwuwarstwy DPPC jest nieznaczny. Zgodnie z wynikami wcześniejszych badań eksperymentalnych **[29, 30]**, uwodnienie dwuwarstwy DPPC ciężką wodą prowadzi do zmniejszenia pola powierzchni na lipid z 0.631 (0.006) nm^2 na 0.619 (0.006) nm^2, większego uporządkowania łańcuchów węglowodorowych DPPC (średnie wartości parametru uporządkowania S_{mol} dla łańcuchów β i γ są o ok. 5-6% wyższe niż w przypadku uwodnienia dwuwarstwy przez wodę lekką), bardziej zwartej struktury hydrofobowego wnętrza dwuwarstwy (przejawiającej się w liczbie najbliższych sąsiadów atomów łańcuchów węglowodorowych) oraz płytszej penetracji wnętrza dwuwarstwy przez cząsteczki wody. Oryginalnym wynikiem naszych badań było opisanie po raz pierwszy cząsteczek tzw. wody kotwiczącej, które znajdując się w pierwszej strefie hydratacyjnej grupy cholinowej tworzą jednocześnie wiązania wodorowe z cząsteczkami lipidów (głównie z atomami tlenu grupy fosforanowej oraz grup karbonylowych). W Tabeli 3 przedstawiono dane dotyczące oddziaływań międzycząsteczkowych między lipidami w dwuwarstwie oraz cząsteczkami wody.

Z analizy danych zebranych w Tabeli 3 wynika, że obecność ciężkiej wody w interfazie dwuwarstwy DPPC nie wpływa w istotny sposób na liczbę wiązań wodorowych lipidów z wodą i pomostów wodnych między cząsteczkami lipidów, uwodnienie grupy cholinowej DPPC, liczbę cząsteczek wody kotwiczącej oraz par ładunkowych. Szczegółowa analiza wykazała również, że deuteracja wody praktycznie nie wpływa na geometrię tworzonych wiązań wodorowych. Warto zauważyć, że cząsteczki wody kotwiczącej, które zostały po raz pierwszy opisane w tej pracy, stanowią niemal 60% cząsteczek wody klatratowej.

	DPPC / H_2O	DPPC / D_2O
wiązania wodorowe lipidów z wodą	6.0 (0.34)	5.8 (0.32)
z udziałem Op DPPC	3.07 (0.05)	3.00 (0.05)
z udziałem Oc DPPC	2.13 (0.05)	2.07 (0.05)
pomosty wodne	1.1 (0.04)	1.1 (0.04)
woda klatratowa	7.56 (0.24)	7.77 (0.25)
woda kotwicząca	4.38 (0.13)	4.34 (0.13)
pary ładunkowe	2.6 (0.04)	2.6 (0.04)

Tabela 3. Średnie liczby wybranych typów oddziaływań międzycząsteczkowych w interfazie dwuwarstwy DPPC uwodnionej wodą lekką i ciężką **[h3]**. W nawiasach podano wartości błędów standardowych.

Badanie dynamiki oddziaływań z udziałem cząsteczek lipidów i wody w interfazie dwuwarstwy DPPC wykazało, że obecność ciężkiej wody wpływa na wyraźne zróżnicowanie w przebiegu procesów związanych z tworzeniem i zrywaniem wiązań wodorowych między lipidami i wodą, pomostów wodnych między cząsteczkami lipidów, jak i par ładunkowych. Dynamika tych procesów była analizowana na podstawie wyników dopasowania sumy eksponencjalnych zaników poszczególnych typów oddziaływań do odpowiednich funkcji korelacji czasowych **[31]**. Dynamikę każdego z rozpatrywanych rodzajów oddziaływań międzycząsteczkowych scharakteryzowano przez określenie parametrów populacji oddziaływań o wyraźnie różnych czasach życia. Najlepsze wyniki dopasowań tych parametrów uzyskano w przypadku, gdy liczba populacji oddziaływań wynosiła cztery. W Tabeli 4 zestawiono względną liczebność populacji oddziaływań (A[1-4]) oraz charakteryzujące je czasy życia (T[1-4]).

Wyraźne zróżnicowanie średnich czasów życia poszczególnych rodzajów oddziaływań wynika z odmiennej natury procesów fizycznych, których przebieg wpływa na tworzenie i zrywanie poszczególnych oddziaływań. Z kolei różnice we względnych wielkościach populacji oddziaływań, widoczne przy porównaniu różnych rodzajów oddziaływań, odzwierciedlają zróżnicowanie znaczenia tych procesów w stabilizowaniu poszczególnych rodzajów oddziaływań.

	Wiązania wodorowe Op		Pary ładunkowe Op		Pomosty wodne	
	H_2O	D_2O	H_2O	D_2O	H_2O	D_2O
A1	23.2	20.6	34.2	32.3	26.5	22.2
T1	3.1	4.1	2.6	2.7	2.5	3.0
A2	39.0	40.0	17.0	16.0	26.6	25.4
T2	26.5	44.6	69.4	85.8	26.2	38.9
A3	30.2	31.1	16.7	17.1	30.7	34.5
T3	110	202	555	708	128	214
A4	7.6	8.3	32.1	34.6	16.2	17.9
T4	481	887	7980	12690	444	956

Tabela 4. Dynamika wybranych oddziaływań w interfazie dwuwarstwy DPPC uwodnionej wodą lekką i ciężką **[h3]**. Względna liczebność populacji oddziaływań (A[1-4]) podana jest w procentach, odpowiednie czasy życia oddziaływań (T[1-4]) podane są w ps. Wartości błędów wyznaczone metodą analizy wariancji nie przekraczają 0.1%.

O ile na czasy życia par ładunkowych wpływa względna ruchliwość grup fosforanowej i cholinowej w głowach polarnych oddziałujących cząsteczek PC, o tyle w przypadku oddziaływań obejmujących wiązania wodorowe (tj. wiązania wodorowe między lipidami a wodą oraz pomosty wodne między lipidami), największe znaczenie dla ich dynamiki ma ruch translacyjny i rotacyjny cząsteczek wody. Do zerwania wiązania wodorowego wystarcza przemieszczenie się cząsteczki wody o około 0.05 nm. Szczegółowe badania dynamiki cząsteczek wody w interfazie dwuwarstwy **[1]** wskazują, że tego typu translacyjny ruch cząsteczek wody realizowany jest w czasie około 2 ps. Zatem to właśnie ten proces wydaje się determinować czasy życia krótkotrwałych oddziaływań (por. populacje 1 w Tabeli 4). Wiązanie wodorowe może być również zrywane w przypadkach, kiedy uczestnicząca w nim cząsteczka wody doświadczy obrotu o więcej niż 30°. Ponieważ tego typu rotacyjna reorientacja cząsteczek wody zachodzi w przedziale czasowym od 70 do 320 ps **[1]**, można spodziewać się, że ten z kolei proces będzie odgrywał kluczową rolę w stabilizacji dłużej żyjących oddziaływań (por. populacje 2 i 3 w Tabeli 4). Najdłuższe czasy życia są obserwowane w przypadku oddziaływań zdegenerowanych (populacje 4 w Tabeli 4), tj. wtedy, gdy oddziaływanie między cząsteczkami jest stabilizowane w tym samym czasie przez więcej niż jedno wiązanie wodorowe lub par ładunkowych. Warto zauważyć, że w przypadku najdłużej żyjących oddziaływań istotną rolę odgrywa zjawisko ciągłego zrywania i odtwarzania oddziaływań, tj. przypadku, kiedy oddziaływanie utworzone przez określone cząsteczki lipidów lub lipidów i wody jest na krótki czas zrywane by następnie być odtworzone w niezmienionej postaci w tej samej grupie oddziałujących cząsteczek.

Wpływ ciężkiej wody na dynamikę oddziaływań w interfazie dwuwarstwy DPPC widoczny jest w wydłużeniu czasów życia oddziaływań długożyjących (por. populacje 2, 3 i 4 w Tabeli 4). Obserwowane jest również statystycznie istotne zwiększenie względnej liczebności długożyjących oddziaływań w dwuwarstwie uwodnionej ciężką wodą. Wydłużenie czasów życia jest największe w przypadku najtrwalszych oddziaływań niezależnie od ich charakteru. W przypadku oddziaływań, w których uczestniczą cząsteczki wody, średni czas życia w populacji najtrwalszych wiązań wodorowych między atomami

tlenu grupy fosforanowej DPPC i wodą rośnie z ~480 do ~890 ps, a czas życia pomostów wodnych w tej populacji rośnie z ~440 do ~960 ps. Co ciekawe, wydłużenie czasu życia obserwowane jest również w przypadku oddziaływań, w których cząsteczki wody bezpośrednio nie uczestniczą, tj. w międzylipidowych parach ładunkowych tworzonych przez atomy tlenu grupy fosforanowej i grupę cholinową głów polarnych DPPC (wzrost z ~8 ns to ~12.7 ns). Uzyskane wyniki, jednoznacznie wskazują, że obecność ciężkiej wody powoduje wyraźne zmiany we własnościach dynamicznych interfazy dwuwarstwy DPPC.

Podsumowanie

Uwodnienie dwuwarstwy DPPC przez ciężką wodę w praktycznie niezauważalny sposób wpływa na statyczny obraz struktury tej dwuwarstwy, a w szczególności jej interfazy. Wpływ obecności ciężkiej wody przejawia się natomiast w wyraźnej zmianie własności dynamicznych interfazy dwuwarstwy DPPC. Zmiany te obejmują zwiększenie populacji długożyjących oddziaływań między lipidami oraz między lipidami i wodą oraz wyraźne wydłużenie czasów życia tych oddziaływań. Uzyskane wyniki zostały w pełni potwierdzone w badanich przeprowadzonych metodami spektroskopii fluorescencyjnej dla dwuwarstw zbudowanych z POPC i DMPC **[10]**.

Wyniki opisane w tej części autoreferatu zostały opublikowane w następującej pracy wchodzącej w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego:

[h3] Róg T, **Murzyn K**, Milhaud J, Karttunen M, Pasenkiewicz-Gierula M (2009) Water Isotope Effect on the Phosphatidylcholine Bilayer Properties: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J Phys Chem B* 113:2378-2387

3. Wpływ ustawień protokołu symulacyjnego oraz parametrów pola siłowego na własności interfazy dwuwarstw zbudowanych z fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanoloaminy, fosfatydyloglicerolu oraz lipidu A.

Ważnym etapem analizy wyników symulacji dynamiki molekularnej dwuwarstw lipidowych jest ocena stanu zrównoważenia termicznego badanego układu oraz jego walidacja, która obejmuje porównanie wybranych własności tego układu z danymi uzyskanymi w niezależnych badaniach. Na tym etapie badań komputerowych często przyjmuje się, że powszechnie stosowane ustawienia protokołu symulacyjnego i parametry pola siłowego pozostają bez wpływu na wyniki przeprowadzonych symulacji komputerowych. Takie założenie oparte jest na przesłankach, które wynikają z wcześniej pomyślnie przeprowadzonych symulacji podobnych układów modelowych.

Istotną częścią protokołu obliczeniowego, według którego przebiega symulacja dynamiki molekularnej, są ustawienia dotyczące traktowania oddziaływań elektrostatycznych. W czasie, w którym nasz zespół prowadził badania dotyczące wpływu traktowania takich oddziaływań na własności dwuwarstw lipidowych, symulacje były prowadzone zazwyczaj z wykorzystaniem tzw. metody promienia odcięcia (RCUT, ang. *cut-off*), w której obliczenia prowadzone kolejno dla każdego atomu w układzie modelowym ograniczone są do atomów znajdujących się w odległości nieprzekraczającej ustalonej wartości (zwykle od 0.9 do 1.4 nm). W alternatywnej metodzie cząstka-sieć Ewalda (PME, ang. *Particle-Mesh Ewald*), w obliczeniach potencjału elektrostatycznego uwzględniane są dodatkowo oddziaływania z atomami bardziej odległymi. W naszych badaniach **[h1]** porównaliśmy wpływ ww. metod traktowania oddziaływań elektrostatycznych na własności interfazy dwuwarstw zbudowanych z PC oraz PE i PG.

Oddziaływania międzyatomowe w modelowych układach dwuwarstw lipidowych są najczęściej parametryzowane w oparciu o pola siłowe CHARMM **[32]**, GROMOS **[33, 34]** i OPLS **[35, 36, h4]**. Popularność tych pól siłowych w badaniach układów cząsteczek o znaczeniu biologicznym wynika z faktu, że granice ich stosowalności są zazwyczaj dosyć dobrze poznane i konsekwentnie poszerzane. W procesie rozwoju pól siłowych ukierunkowanym na parametryzację cząsteczek lipidów szczególnie ważne jest zapewnienie przenaszalności nowych parametrów oraz ich walidacja w szerokim zakresie temperatur. Przenaszalność parametrów pola siłowego oznacza, że te same grupy funkcyjne w różnych cząsteczkach mają przypisane te same parametry a własności całych cząsteczek wynikają z wzajemnego rozmieszczenia tak sparametryzowanych grup funkcyjnych. Unikalną cechą lipidów jest zależność własności fizykochemicznych faz, które tworzą w środowisku wodnym, od temperatury. W przypadku symulacji dynamiki molekularnej dwuwarstw lipidowych, parametryzacja lipidów powinna pozwalać na odtwarzanie własności stanu fazowego właściwego temperaturze ustawionej w symulacji. W publikacjach naszego zespołu **[h4, h5]** zwróciliśmy uwagę na to, jaki wpływ na odtwarzanie własności stanu fazowego dwuwarstwy zbudowanej z lipoglikanu ma właściwa parametryzacja zarówno grup funkcyjnych głowy polarnej lipidu jak i jego hydrofobowej części.

W innej publikacji **[h1]** opisujemy wpływ sposobu traktowania oddziaływań elektrostatycznych w SDM na własności interfazy wybranych dwuwarstw lipidowych zbudowanych z PC oraz PE i PG. Wszystkie wymienione fosfolipidy mają tę samą część hydrofobową, na którą składają się łańcuchy oleilowy i palmitoilowy w pozycjach, odpowiednio, *sn-2* i *sn-3*. W środowisku neutralnym (pH ~7), PC i PE są jonami obojnaczymi z ładunkiem ujemnym zlokalizowanym na grupie fosforanowej oraz ładunkiem dodatnim, odpowiednio, na grupie cholinowej oraz aminowej. W tym samym środowisku, cząsteczka PG ma ładunek -1*e*. Symulacje każdej z badanych dwuwarstw lipidowych zostały

przeprowadzone z wykorzystaniem metody RCUT albo PME. Analiza trajektorii uzyskanych w symulacjach obejmowała wyznaczenie własności strukturalnych i dynamicznych zarówno hydrofobowego wnętrza dwuwarstwy, jak i jej interfazy.

W Tabeli 5 przedstawiono wybrane własności przestrzeni interfazowej w obu badanych dwuwarstwach lipidowych. W przypadku dwuwarstwy zbudowanej z PC, nie ma statystycznie istotnej różnicy w liczbie analizowanych oddziaływań międzycząsteczkowych. Takie różnice są natomiast widoczne w przypadku dwuwarstwy zbudowanej z PE i PG.

Jak wykazały wyniki badań naszego zespołu, wybór metody traktowania oddziaływań elektrostatycznych w symulacjach dwuwarstwy zbudowanej z PE i PG ma duży wpływ na własności strukturalne i dynamiczne badanego układu modelowego. O ile szerokość dwuwarstwy zbudowanej z PC i odpowiednia wartość pola powierzchni na lipid są praktycznie takie same w symulacjach prowadzonych z wykorzystaniem alternatywnych metod traktowania oddziaływań elektrostatycznych, o tyle w przypadku PE i PG, szerokość dwuwarstwy w symulacji prowadzonej z wykorzystaniem metody RCUT jest większa o około 0.3 nm niż w symulacji prowadzonej z wykorzystaniem metody PME. Zmianie w szerokości dwuwarstwy towarzyszy zwiększenie pola powierzchni na PE z 0.583 nm^2 (RCUT) do 0.61 nm^2 (PME) oraz zmniejszenia pola powierzchni na PG z 0.639 nm^2 (RCUT) do 0.628 nm^2 (PME). Wykorzystanie metody RCUT do traktowania oddziaływań elektrostatycznych w dwuwarstwie PE / PG ma nieoczekiwany wpływ na dynamikę cząsteczek PG. Wyznaczony przez nas współczynnik dyfuzji translacyjnej tego lipidu w symulacji RCUT jest ponad 30-krotnie niższy niż w symulacji prowadzonej z wykorzystaniem metody PME. Z kolei wartości tego współczynnika dla PC i PE zdają się nie zależeć od wyboru protokołu traktowania oddziaływań elektrostatycznych.

Badania naszego zespołu dotyczące stosowania alternatywnych metod traktowania oddziaływań elektrostatycznych w symulacjach dynamiki molekularnej dwuwarstw lipidowych pozwoliły scharakteryzować wpływ różnic w oddziaływaniach między głowami polarnymi lipidów i wodą w interfazie dwuwarstwy na strukturę przestrzenną i dynamikę cząsteczek lipidów w dwuwarstwach zbudowanych z PC oraz PE i PG. Brak istotnego wpływu metody traktowania oddziaływań elektrostatycznych na własności jednoskładnikowej dwuwarstwy zbudowanej z elektroobojętnych cząsteczek PC wskazuje, że w obliczeniach energii potencjalnej układu pomijanie wkładu dalekich oddziaływań elektostatycznych jest fizycznie dopuszczalne i uzasadnione ze względów praktycznych. W przypadku dwuwarstw zbudowanych z naładowanych cząsteczek lipidów wykorzystanie metody promienia odcięcia prowadzi jednak do błędnego odtwarzania fizycznych własności badanej dwuwarstwy.

	lipid	PME	RCUT
cząsteczki wody związanej wodorowo z cząsteczkami lipidów	PC	4.9 (0.1)	5.0 (0.1)
	PE	5.8 (0.1)	7.3 (0.1)
	PG	5.1 (0.1)	8.3 (0.1)
mostki wodne między lipidami	PC	0.6 (0.1)	0.5 (0.1)
	PE	1.6 (0.1)	1.9 (0.1)
	PG	2.0 (0.1)	2.6 (0.1)
wiązania wodorowe między lipidami	PE	1.1 (0.1)	0.6 (0.1)
	PG	1.3 (0.1)	0.9 (0.1)
pary ładunkowe między lipidami	PC	1.7 (0.1)	1.7 (0.1)
cząsteczki wody w powłoce hydratacyjnej grupy cholinowej	PC	6.4 (0.1)	6.6 (0.2)

Tabela 5. Liczebność poszczególnych rodzajów oddziaływań międzycząsteczkowych w interfazie dwuwarstwy o różnym składzie lipidowym w symulacjach dynamiki molekularnej prowadzonych z wykorzystaniem odmiennych sposobów traktowania oddziaływań elektrostatycznych (tj. **PME**: metoda cząstka-sieć Ewalda, **RCUT**: metoda promienia odcięcia oddziaływań niewiążących). Dane na podstawie **[h1, h2]**.

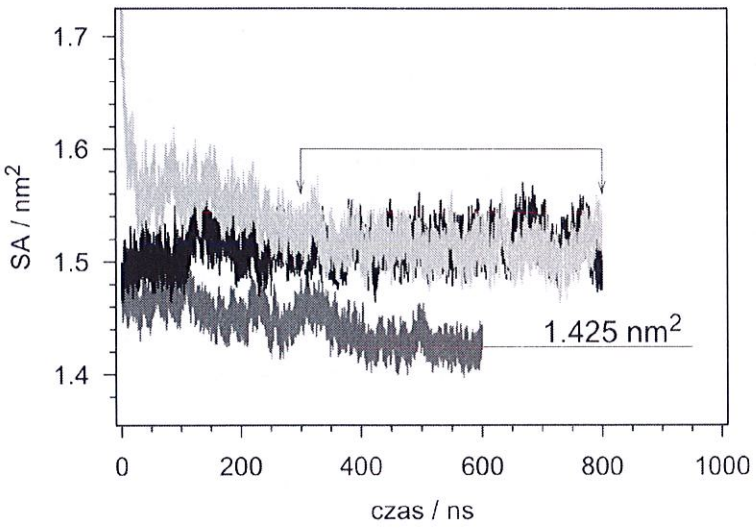
W modelowaniu molekularnym cząsteczki reprezentowane są jako grupa połączonych ze sobą atomów, z których każdy obdarzony jest masą i ładunkiem. W procesie parametryzacji cząsteczek mogą one zostać podzielone na grupy atomów (tzw. grupy ładunkowe), tak aby ich wypadkowy ładunek był bliski zeru. W metodzie promienia odcięcia kryterium odległości jest wtedy stosowane nie do odległości między atomami, ale do odległości między środkami geometrycznymi odpowiednio zdefiniowanych grup ładunkowych. Przy bliskich zeru wartościach ładunku rozpatrywanych grup atomów, realny wkład do energii potencjalnej mają wtedy oddziaływania między trwałymi momentami dipolowymi tych grup ładunkowych. Ponieważ energia oddziaływań między dipolami zanika szybciej z odległością niż w przypadku oddziaływań między ładunkami punktowymi, pomijanie w obliczeniach dalekich oddziaływań między trwałymi dipolami okazuje się być fizycznie uzasadnione. W przypadku ujemnie naładowanej cząsteczki fosfatydyloglicerolu, jej podział na grupy atomów o ładunku bliskim zeru nie jest możliwy, co sprawia, że w metodzie promienia odcięcia pomijany jest istotny wkład dalekich oddziaływań elektrostatycznych do energii potencjalnej układu, co ostatecznie prowadzi do błędnego wyznaczania sił działających na atomy.

Niedokładności w obliczeniach oddziaływań w interfazie dwuwarstwy lipidowej mogą wynikać nie tylko z nieodpowiedniego doboru metody traktowania oddziaływań elektrostatycznych, ale również z nieoczywistych ograniczeń parametryzacji fragmentów głów polarnych lipidów. W badaniach naszego zespołu **[h4]** przeprowadziliśmy dokładną walidację parametrów pola siłowego OPLS, przypisywanych atomom grupy estrowej i fosforanowej. Parametry grupy estrowej wykorzystywane są przy parametryzacji tych fragmentów cząsteczek lipidów, w których głowa polarna połączona jest z łańcuchami węglowodorowymi (por. Rys. 1). Grupa fosforanowa z kolei będąc ujemnie naładowaną, hydrofilową częścią głowy polarnej wielu lipidów uczestniczy w licznych oddziaływaniach z cząsteczkami innych lipidów i wody w interfazie.

Oryginalna parametryzacja grupy estrowej w polu siłowym OPLS **[36, 37]** wyprowadzona dla modelowej cząsteczki octanu metylu pozwala dobrze odtwarzać szereg własności fizykochemicznych tego związku w fazie ciekłej w symulacjach dynamiki molekularnej wykorzystującej alternatywne metody traktowania oddziaływań elektrostatycznych, takie jak metoda PME i RCUT. Badania naszego zespołu **[h4]** wskazały, że o ile ciepło parowania i gęstość octanu metylu w stanie ciekłym nie różnią się znacząco od referencyjnych wartości wyznaczonych w badaniach eksperymentalnych, o tyle oryginalny rozkład ładunków punktowych w grupie estrowej **[37]** nie pozwala na poprawne odtwarzanie wartości i zwrotu momentu dipolowego oraz energii swobodnej hydratacji. Wykorzystanie nowego zestawu ładunków punktowych **[h4, 38]** w symulacjach dynamiki molekularnej układu cząsteczek octanu metylu w fazie ciekłej pozwoliło na pomyślne odtworzenie wszystkich czterech ww. własności fizykochemicznych tej cząsteczki.

W badaniach naszego zespołu **[h4]** wskazaliśmy również na potrzebę poprawy parametryzacji grupy fosforanowej i hydroksyfosforanowej. Na podstawie wyznaczonych przez nas własności fizykochemicznych dla modelowej cząsteczki kwasu dimetylofosforanowego (DMPH) oraz anionu dimetylofosforanowego (DMP^-), zaproponowaliśmy poprawione parametry oddziaływań van der Waalsa oraz nowy zestaw ładunków punktowych, które pozwalają na lepsze odtwarzanie referencyjnych wartości ciepła parowania i gęstości fazy ciekłej DMPH oraz momentu dipolowego i energii swobodnej hydratacji DMP^-.

Nowe parametry grupy estrowej i hydroksyfosforanowej w polu siłowym OPLS zostały przez nas pomyślnie zastosowane w symulacjach dynamiki molekularnej LA **[h5]** o strukturze chemicznej charakterystycznej dla lipoglikanów tworzących zewnętrzny listek zewnętrznej błony bakterii Gram-ujemnych. Wyniki innych, nieopublikowanych jeszcze badań dotyczących dwuwarstwy lipidowej zbudowanej z DPPC lub LPS wskazują, że nowe parametry pola siłowego OPLS są w pełni przenaszalne i mogą być stosowane przy parametryzacji różnych fosfolipidów. Znaczenie wprowadzonych zmian w parametryzacji grupy hydroksyfosforanowej jest widoczne w wynikach badań porównawczych **[h5]**, w których symulacje dwuwarstwy zbudowanej z LA zostały przeprowadzone z wykorzystaniem zarówno oryginalnych, jak i nowych parametrów OPLS. Na rysunku 4 przedstawiono zmianę wartości pola powierzchni na lipid w czasie symulacji dynamiki molekularnej dwuwarstwy zbudowanej z LA. Parametryzacja cząsteczek lipidów w porównywanych symulacjach różniła się jedynie parametrami przypisanymi grupom hydroksyfosforanowym. Wykorzystanie nowych parametrów **[h5]** pozwala poprawnie odtworzyć własności analizowanej dwuwarstwy w fazie ciekłokrystalicznej. W przypadku zastosowania oryginalnych parametrów grupy hydroksyfosforanowej obserwowany jest ciągły proces obniżania pola powierzchni na lipid oraz wzrost uporządkowania łańcuchów węglowodorowych co wskazuje na przechodzenie dwuwarstwy w fazę żelową. Nasze badania pokazały w jaki sposób braki w parametryzacji względnie niewielkiego fragmentu głowy polarnej lipidu (tu: 14 spośród 305 atomów cząsteczki LA) uniemożliwiają poprawne odtwarzanie własności dwuwarstwy lipidowej. Ważnym wnioskiem wypływającym z naszych badań jest potrzeba niezależnej oceny poprawności parametryzacji różnych fragmentów cząsteczki lipidu, a w szczególności tych grup chemicznych w głowie polarnej lipidu, które mogą tworzyć wiązania wodorowe w interfazie dwuwarstw lipidowych.



Rysunek 4.

Zmiana wartości pola powierzchni na lipid (SA) w czasie symulacji dynamiki molekularnej dwuwarstwy zbudowanej z cząsteczek LA, w których grupy hydroksyfosforanowe zostały sparametryzowane z wykorzystaniem oryginalnych **[36]** (linia ciemnoszara) oraz nowych **[h4]** (linia jasnoszara i czarna) parametrów pola siłowego OPLS.

Podsumowanie

W przypadkach kiedy dwuwarstwa zbudowana jest z lipidów obdarzonych niezerowym ładunkiem całkowitym, poprawny przebieg symulacji jej dynamiki molekularnej wymaga możliwie dokładnego obliczania wkładu długozasięgowych oddziaływań elektrostatycznych do energii potencjalnej układu molekularnego. Jedną z metod obliczeniowych, której zastosowanie daje dobre wyniki w symulacjach dwuwarstw zbudowanych z nieobojętnych elektrycznie cząsteczek lipidów, jest metoda cząstka-sieć Ewalda. W badaniach dwuwarstw lipidowych prowadzonych metodą symulacji dynamiki molekularnej szczególną uwagę należy zwrócić na odpowiednią parametryzację oddziaływań między lipidami w interfazie dwuwarstwy. Wynikiem braków w parametrach pola siłowego przypisywanym nawet niewielkim fragmentom głowy polarnej lipidów może być niewłaściwe odtwarzanie stanu fazowego dwuwarstwy lipidowej.

Wyniki opisane w tej części autoreferatu zostały opublikowane w następujących trzech pracach wchodzących w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego:

[h1] Róg T, **Murzyn K**, Pasenkiewicz-Gierula M (2003)
Molecular dynamics simulations of charged and neutral lipid bilayers: treatment of electrostatic interactions. *Acta Biochim Polon* 50(3):789-798

[h4] **Murzyn K**, Bratek M, Pasenkiewicz-Gierula M (2013)
Refined OPLS All-Atom Force Field Parameters for n-Pentadecane, Methyl Acetate, and Dimethyl Phosphate. *J Phys Chem B* 117:16388-16396

[h5] **Murzyn K**, Pasenkiewicz-Gierula M (2015)
Structural Properties of the Water/Membrane Interface of a Bilayer Built of the *E. coli* Lipid A. *J Phys Chem B* 119:5846–5856

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

W chwili **uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych**, tj. pod koniec lutego 2002, mój dorobek naukowy obejmował **4 publikacje w czasopismach z listy filadelfijskiej** (por. **załącznik 4**) o sumarycznym **współczynniku oddziaływania** wynoszącym **8.48**, łącznej **liczbie cytowań 8** i **współczynniku Hirscha** równym **2**.

Moje ówczesne zainteresowania naukowe, które widoczne były w moich publikacjach z tego okresu obejmowały: (1) analizę wpływu konfiguracji wiązania podwójnego w pozycji 9 łańcucha *sn-2* fosfatydylocholin na własności dwuwarstw z nich zbudowanych, (2) analizę ruchliwości wody oddziałującej z głowami polarnymi fosfatydylocholiny palmitoilo-oleilowej, (3) zagadnienia związane z konstrukcją i równoważeniem termicznym modelowych dwuwarstw zbudowanych z PE i PG, (4) molekularne podstawy selektywnego działania magaininy: peptydu o aktywności antybakteryjnej.

We wrześniu 2002 roku, jako wykonawca, rozpocząłem udział w realizacji projektu badawczego 3 P04A 043 23 "Mechanizmy oddziaływań międzydomenowych w łańcuchu wysokopotencjalnych centrów oksydacyjno-redukcyjnych kompleksu białkowego cytochrom c – cytochrom bc1 (reduktaza cytochromu c)" kierowanego przez Prof. dr. hab. Wojciecha Froncisza. W publikacji w *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **[39]** zostały opisane wyniki uzyskane z moim udziałem w ramach realizacji tego projektu. Uzyskane wyniki pozwoliły powiązać obserwowane widmo elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) białka znakowanego spinowo z konfiguracją wiązania disiarczkowego w znaczniku spinowym.

W roku 2003 ukazała się publikacja **[40]** dokumentująca kilkuletni rozwój specjalistycznego oprogramowania do analizy trajektorii dynamiki molekularnej wspomagającej interpretacje widm rozpraszania neutronowego rozwijanego z inicjatywy Prof. Dr hab. Geralda Knellera wraz z Dr. Konradem Hinsenem (obaj z Centre de Biophysique Moléculaire w Orleanie we Francji) oraz Dr. Tomaszem Rogiem (WBBiB UJ).

W roku 2004 nawiązałem wewnątrzwydziałową współpracę z Dr hab. Jolantą Jurą (Zakład Biochemii Komórki WBBiB UJ) obejmującą wykorzystanie bioinformatyki w badanich prowadzonych przez Jej zespół. Mój udział w pierwszych wspólnie prowadzonych badaniach obejmował identyfikację miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych w rejonie promotorowym szczurzego genu kwaśnej serwatki (WEP). Wyniki tych badań zostały opublikowane w *BBA – Gene, Structure, Expression* **[41]**. Badania kierowane przez Dr hab. Jolantę Jurę były prowadzone w ramach realizowanego w latach 2004 – 2007 projektu badawczego 2 P05A 011 27 pt. "Charakterystyka genów zidentyfikowanych metodą różnicowej ekspresji w aktywowanych interleukiną-1 komórkach HepG2", w których byłem jednym z wykonawców. Oddzielny nurt wspólnie prowadzonych badań obejmował zastosowanie technik bioinformatycznych do badania architektury domenowej ludzkiego białka MCPIP1. Przeprowadzone przeze mnie badania pozwoliły wykryć w sekwencji MCPIP1 domenę NCD (konserwatywna domena białka NAB (ang. *Nuclear ABundant poly(A) RNA-binding protein*)) wykazującą aktywność rybonukleazy. Wyniki te zostały opublikowane w *FEBS Journal* **[42]**.

W roku 2006 w *Biointerphases* ukazała się publikacja **[43]**, której byłem pierwszym autorem. Wyniki opisane w tej publikacji dotyczyły wpływu struktury chemicznej głów polarnych lipidów na dynamikę translacyjną i rotacyjną wody w interfazie dwuwarstw zbudowanych z PC, PE i PG. Z powodów formalnych (brak pisemnego oświadczenia jednego z czterech

współautorów tej publikacji) ta publikacja (**Załącznik 7**) nie została włączona do cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego. Wei Zhao był w chwili prowadzenia tych badań doktorantem innego współautora tej publikacji, Prof. Mikko Kartunnena. Od czasu uzyskania przez niego stopnia doktora w 2006 roku, żaden ze współautorów publikacji w *Biointerphases* **[43]** nie ma z nim kontaktu. Podejmowane próby nawiązania kontaktu w celu uzyskania jego oświadczenia jako współautora tej publikacji nie powiodły się. Z uwagi na zbieżność tematyki tej publikacji z osiągnięciem naukowym stanowiącym podstawę postępowania habilitacyjnego, w **załączniku 6PL** przedstawiono bardziej szczegółowy opis uzyskanych wyników i ich znaczenia dla prowadzonych przez nasz zespół badań interfazy woda/dwuwarstwa lipidowa. W **załączniku 8** zawarto oświadczenia trzech pozostałych współautorów publikacji w *Biointerphases* **[43]**.

W latach 2007 – 2009 uczestniczyłem jako główny wykonawca w realizacji kierowanego przez Prof. dr hab. Martę Pasenkiewicz-Gierulę projektu badawczego zamawianego PBZ-MNiI-1/1/2005 pt. "Przewidywanie molekularnych podstaw działania błonowo czynnych związków antybakteryjnych". Część spośród uzyskanych wyników została opublikowana w *Journal of Peptide Science* **[44]** oraz *Acta Biochimica Polonica* **[45]**.

W roku 2008 odbywałem staże naukowe, kolejno na University of Virginia (Charlottesville, Virginia, Stany Zjednoczone Ameryki; 3.5 miesiąca w okresie od lutego do czerwca) oraz University of Glasgow (Glasgow, Szkocja, Zjednoczone Królestwo Wielkiej Brytanii i Irlandii; 2 miesiące w okresie od lipca do sierpnia). Wynikiem wizyty naukowej w Charlottesville było nawiązanie współpracy z Prof. Wladkiem Minorem i Dr. Maksymilianem Chruszczem oraz udział w dwóch projektach badawczych zakończonych publikacjami w *Protein Science* **[46]** oraz *FEBS Journal* **[47]**. Pierwsza z publikacji zawiera wyniki badań oddziaływań między łańcuchami bocznymi aminokwasów na powierzchni krystalizowanych białek, druga dokumentuje wykrycie silnie konserwatywnej struktury syntetazy detiobiotyny przy niskim podobieństwie sekwencji odpowiednich białek homologicznych. Wizyta w Bioinformatics Reseearch Centre przy University of Glasgow odbywała się w ramach realizacji projektu wymiany kadr akademickich finansowanych ze środków Unii Europejskiej (projekt MTKD-CT 2006-042586). Pobyt w Glasgow pozwolił poszerzyć moje doświadczenie w zakresie stosowania technik badawczych z zakresu bioinformatyki i biologii systemów, które wykorzystałem przy okazji opracowywania zajęć dydaktycznych prowadzonych dla studentów rodzimego wydziału UJ.

W roku 2008 nawiązałem współpracę z Prof. Joanną Cichy (Zakład Immunologii WBBiB UJ), obejmującą wykorzystanie bioinformatyki i modelowania molekularnego w badaniach prowadzonych przez Jej zespół. W latach 2008 – 2011 uczestniczyłem jako wykonawca w badaniach kierowanych przez Prof. Joannę Cichy w ramach realizacji projektu badawczego N401003636 pt. "Rola metaloproteinazy ADAM17 w regulacji odpowiedzi odpornościowej". Począwszy od roku 2011 współpraca z Prof. Joanną Cichy objęła badania antybakteryjnych własności peptydów uwalnianych w wyniku proteolitycznej degradacji ludzkiego białka chemeryny. Moim wkładem w te badania, było zaproponowanie molekularnego mechanizmu działania tych peptydów i wskazanie tych spośród ich własności fizykochemicznych, które korelują z ich obserwowaną aktywnością biologiczną. Uzyskane wyniki zostały opisane w artykule opublikowanym w *PLOS One* **[48]**. Peptydy antybakteryjne wywodzące się z ludzkiej chemeryny oraz ich farmakologiczne zastosowanie są przedmiotem zgłoszeń patentowych nr ZP/P-177/MC i PCT/IB2013/061001. W roku 2014 włączyłem się do prowadzonych przez prof. Joannę Cichy badań dotyczących wydzielczniczego inhibitora proteaz leukocytowych (SLPI, ang. *Secretory leukocyte protease inhibitor*). Wynikiem dotychczasowej współpracy w tym zakresie jest publikacja przeglądowa w *Cytokine & Growth Factor Reviews* **[49]**.

W grudniu 2011 roku rozpocząłem jako kierownik i główny wykonawca realizację projektu badawczego 2011/01/B/NZ1/00081 pt. "Własności strukturalne i dynamiczne modelowej błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych" w programie OPUS Narodowego Centrum Nauki. Projekt badawczy obejmuje opis własności modelowych dwuwarstw zbudowanych z dwóch rodzajów LA, pięciu różnych LPS oraz PE. Realizacja projektu zakończyła się w 2014 roku, a jego wyniki zostały dotychczas opublikowane w *Journal of Physical Chemistry B* **[h4, h5]**, *Journal of Chemical Information and Modeling* **[50]** oraz *BBA – Biomembranes* **[51]**.

> Na obecną chwilę (listopad, 2016), jestem współautorem **29 publikacji** (**Załącznik 3**) o sumarycznym **współczynniku oddziaływania** wynoszącym **71.723**, łącznej **liczbie cytowań 768** (liczba cytowań bez autocytowań wynosi 722) i **współczynniku Hirscha** równym **15**. Wyniki badań naszego zespołu były prezentowane przeze mnie na krajowych i międzynarodowych konferencjach w postaci **5 wykładów i komunikatów konferencyjnych** oraz ponad **30 prezentacji posterowych**.

Moja dotychczasowa praca naukowa została nagrodzona przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej przyznaniem stypendium dla młodych naukowców w latach 2001 i 2002. W roku 2002, wspólnie z prof. Martą Pasenkiewicz-Gierulą i dr. Tomaszem Rogiem otrzymaliśmy zespołową nagrodę Ministra Edukacji i Sportu. W roku 2003 w uznaniu dotychczasowych osiągnięć, Jego Magnificencja Rektor Uniwersytetu Jagiellońskiego przyznał mi nagrodę indywidualną drugiego stopnia. W roku 2004 wspólnie z prof. Martą Pasenkiewicz-Gierulą i Dr. Tomaszem Rogiem otrzymaliśmy decyzją Jego Magnificjencji Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego zespołową nagrodę pierwszego stopnia. W roku 2006 zostałem nagrodzony rocznym stypendium z Fundacji im. Adama Krzyżanowskiego.

W najbliższej przyszłości zamierzam skoncentrować się nad badaniami faz lamelarnych i nielamelarnych tworzonych przez lipidy bakteryjne takie jak: LPS, PE i PG. Realizacji tych planów służy poszerzenie spektrum wykorzystywanych w naszym zespole metod badawczych zarówno o symulacje grubo-ziarniste jak i symulację dynamiki molekularnej metodą Car-Parinello. Mam nadzieję, że wydłużenie skali czasowej prowadzonego modelowania molekularnego, poszerzanie zakresu stosowalności pól siłowych wykorzystywanych przez nas w badaniach oraz systematyczne poprawianie braków w parametryzacji różnych cząsteczek lipidów pozwolą w nieodległej przyszłości uzyskać wartościowe wyniki poszerzające nasze rozumienie molekularnych podstaw procesów fizycznych zachodzących z udziałem lipidów bakteryjnych.

6. Omówienie osiągnięć organizacyjnych i dydaktycznych

Moja aktywność naukowa jest ściśle związana z intensywnie prowadzoną **działalnością organizacyjną i dydaktyczną**. Już w trakcie studiów doktoranckich aktywnie uczestniczyłem w tworzeniu nowych kursów dla studentów Biotechnologii, Chemii i Biologii Molekularnej prowadzonych w ówczesnym Instytucie Biologii Molekularnej UJ. W 1999 roku pod redakcją dr. hab. Marty Pasenkiewicz-Gieruli ukazał się skrypt pt. „Modelowanie molekularne biocząsteczek – ćwiczenia z podstaw i zastosowań", którego jestem współautorem. W ramach programu Unii Europejskiej *Centrum Doskonałości* (ICA1-CT-2000-70012) współfinansowanego przez Komitet Badań Naukowych (SPUB-M3018), przygotowałem pierwszy na Uniwersytecie Jagiellońskim kurs bioinformatyki, który od 2002 roku pozostaje kursem obowiązkowym dla studentów WBBiB UJ. Od roku 2004 brałem czynny udział w pracach kierowanych przez Prof. Dr hab. Martę Pasenkiewicz-Gierulę zmierzających do otwarcia nowych 5-letnich studiów kierunku Biofizyka w roku 2006. Mój udział w tych pracach obejmował przygotowanie zaawansowanego kursu z bioinformatyki, podstaw obsługi komputera, administrowania systemami operacyjnymi GNU/Linux oraz programowania w językach C i Python. Od roku akademickiego 2014/15 prowadzę kurs z bioinformatyki dla studentów anglojęzycznych. Łącznie z wcześniej wspomnianym kursem z podstaw bioinformatyki, prowadzone przeze mnie zajęcia dydaktyczne obejmują corocznie ponad 50h różnych wykładów i 100h różnych ćwiczeń. Obecnie w koordynowanych przeze mnie kursach bierze udział co roku ponad 200 studentów czterech kierunków z dwóch wydziałów UJ. W okresie od 2004 do chwili obecnej sprawowałem merytoryczną opiekę nad dziesięcioma pracami magisterskimi oraz trzema pracami licencjackimi. Spośród dziesięciorga moich magistrantów, sześcioro jest obecnie uczestnikami studiów doktoranckich w Stanach Zjednoczonych, Szwajcarii, Portugalii, Niemczech i Polsce. Od dwóch lat sprawuje merytoryczną opiekę nad dwoma doktorantami WBBiB UJ.

W roku 2008 wspólnie z dr. Marcinem Kurdzielem i dr. Piotrem Liguzińskim dokonałem przekładu z języka angielskiego na język polski podręcznika do bioinformatyki „Bioinformatics and molecular evolution" autorstwa Paula Higgsa i Teresy Attwood. Jako redaktor naukowy przekładu dbałem o popawność merytoryczną i językową. Pierwsze wydanie książki doczekało się dodruku i obecnie jest ciągle jednym z popularniejszych podręczników bioinformatyki w Polsce.

Od roku 2010 uczestniczę w opracowaniu programu studiów nowej specjalizacji Bioinformatyka na studiach pierwszego stopnia prowadzonych przez Wydział Matematyki i Informatyki (WMiI), WBBiB oraz Instytut Nauk o Środowisku Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ. Pierwsza rekrutacja na nową specjalność odbyła się w roku akademickim 2011/12. Łącznie na trzech latach studiów licencjackich kształci się ponad 50 studentów.

W roku 2011 otrzymałem indywidualną nagrodę trzeciego stopnia Jego Magnificencji Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego za szczególne osiągnięcia dydaktyczne. W roku 2015, w ramach wydziałowego zespołu powołanego przez Prodziekan ds. dydaktyki prof. Martę Dziedzicką-Wasylewską, uczestniczyłem w przygotowaniu dokumentacji i formalnych wniosków związanych z otwarciem nowego kierunku studiów drugiego stopnia "Bioinformatyka z biofizyką stosowaną" a następnie, w październiku 2016 objąłem stanowisko kierownika tych studiów.

Krzysztof Murzyn

Literatura

h1. Róg T, Murzyn K, Pasenkiewicz-Gierula M (2003) Molecular dynamics simulations of charged and neutral lipid bilayers: treatment of electrostatic interactions. *Acta Biochim Polon* 50:789-798

h2. Murzyn K, Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M (2005) Phosphatidylethanolamine-Phosphatidylglycerol Bilayer as a Model of the Inner Bacterial Membrane. *Biophys J* 88:1091-1103

h3. Róg T, Murzyn K, Milhaud J, Karttunen M, Pasenkiewicz-Gierula M (2009) Water Isotope Effect on the Phosphatidylcholine Bilayer Properties: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J Phys Chem B* 113:2378-2387

h4. Murzyn K, Bratek M, Pasenkiewicz-Gierula M (2013) Refined OPLS All-Atom Force Field Parameters for n-Pentadecane, Methyl Acetate, and Dimethyl Phosphate. *J Phys Chem B* 117:16388-16396

h5. Murzyn K, Pasenkiewicz-Gierula M (2015) Structural Properties of the Water/Membrane Interface of a Bilayer Built of the *E. coli* Lipid A *J Phys Chem B* 119:5846–5856

1. Róg T, Murzyn K, Pasenkiewicz-Gierula M (2002) The dynamics of water at the phospholipid bilayer surface: a molecular dynamics simulation study. *Chem Phys Lett* 352:323-327

2. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112–124

3. Murzyn K, Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M (2004) Interactions of magainin-2 amide with membrane lipids. *Lect Notes in Comput Sci* 3037:325-331

4. Seeman P (1972) The Membrane Actions of Anesthetics and Tranquilizers. *Pharmacol Rev* 24:583-655

5. Leach A (2001) Molecular Modelling: Principles and Applications (2nd Edition). Pearson

6. Frenkel D, Smit B (2001) Understanding Molecular Simulation, Second Edition: From Algorithms to Applications. *Academic Press.*

7. Nagle JF, Tristram-Nagle S (2002) Structure of lipid bilayers. *BBA* 1469:159-195

8. Berger O, Edholm O, Jahnig F. (1997) Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys J* 72: 2002–2013

9. Patra M, Karttunen M, Hyvonen MT, Falck E, Vattulainen I (2004) Lipid bilayers driven to a wrong lane in molecular dynamics simulations by subtle changes in long-range electrostatic interactions. *J Phys Chem B* 108:4485–4494

10. Baranova L, Humpoličková J, Sýkora J, Benda A, Cwiklik L, Jurkiewicz P, Gröbner G, Hof M (2012) Effect of heavy water on phospholipid membranes: experimental confirmation of molecular dynamics simulations. *Phys Chem Chem Phys* 14:14516-14522

11. Yorek,MA (1993) Biological distribution. *In* Phospholipids Handbook. Cevc, editor. Marcel Dekker Inc., New York, NY

12. Aktas M., Wessel M., Hacker S., Klűsener S, Gleichenhagen J, Narberhaus F (2010) Phosphatidylcholine biosynthesis and its significance in bacteria interacting with eukaryotic cells. *Eur J Cell Biol* 89:888-894

13. Hanada, T.; Kashima, Y.; Kosugi Y., Koizumi Y, Yanagida F, Udaka S. (2001) A gene encoding phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from *Acetobacter aceti* and some properties of its disruptant. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:2741-2748

14. Dowhan W (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem* 66:199-232

15. Wang X, Ribeiro AA, Guan Z, McGrath SC, Cotter RJ, Raetz CRH (2003) Structure and Biosynthesis of Free Lipid A Molecules That Replace Lipopolysaccharide in *Francisella tularensis* Subsp. *novicida*. *Biochemistry* 45:14427-14440

16. Murzyn K, Róg T, Jezierski G, Takaoka Y, Pasenkiewicz-Gierula M (2001) Effects of Phospholipid Unsaturation on the Membrane/Water Interface: A Molecular Simulation Study. *Biophys J* 81:170-183

17. Mares J, Kumaran S, Gobbo M, Zerbe O (2009) Interactions of Lipopolysaccharide and Polymyxin Studied by NMR Spectroscopy. *J Biol Chem* 284:11498-11506

18. Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M, Vattulainen I, Karttunen M (2009) Ordering effects of cholesterol and its analogues. *BBA-Biomembranes* 1788:97–121

19. Lounnas V, Wade RC (1997) Exceptionally stable salt-bridges in cytochrome P450cam have functional roles. *Biochemistry* 36:5402-5417

20. Pasenkiewicz-Gierula M, Takaoka Y, Miyagawa H, Kitamura K, Kusumi A (1997) Hydrogen bonding of water to phosphatidylcholine in the membrane as studied by a molecular dynamics simulation: Location, geometry, and lipid-lipid bridging via hydrogen-bonded water. *J Phys Chem A* 101:3677-3691

21 Pasenkiewicz-Gierula M, Takaoka Y, Miyagawa H, Kitamura K, Kusumi A (1999) Charge-pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes. A molecular dynamics simulation study. *Biophys J* 76:1228-1240

22. Weber FJ, de Bont JAM (1996) Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *BBA* 1286:225-245

23. Garidel P, Blume A (2000) Miscibility of phosphatidylethanolamine-phoshpatidylglcyerol mixtures as a function of pH and acyl chain length. *Eur Biophys J* 28:629-638

24. Chaplin M (2000) Water structure and science. **http://goo.gl/IYFXKE**

25. Kushner DJ, Baker A, Dunstall TG (1999) Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds. *Can J Physiol Pharmacol* 77:79-88

26. Sasisanker P, Oleinikova A, Weingartner H, Ravindra R, Winter R (2004) Solvation properties and stability of ribonuclease A in normal and deuterated water studied by dielectric relaxation and differential scanning/pressure perturbation calorimetry. *Phys Chem Chem Phys* 6:1899–1905

27. Chakrabarti G, Kim S., Gupta ML Jr., Barton JS, Himes RH. (1999) Stabilization of Tubulin by Deuterium Oxide. *Biochemistry* 38:3067-3072

28. Guzzi R, Arcangeli C, Bizzarri AR (1999) A molecular dynamics simulation study of the solvent isotope effect on copper plastocyanin. *Biophys Chem* 82:9-22

29. Matsuki H, Okuno H, Sakano F, Kusube M, Keneshina S. (2005) Effect of deuterium oxide on the thermodynamic quantities associated with phase transitions of phoshpatidylcholine bilayer membranes. *BBA* 1712:92-100

30. Tokutake N, Jing B, Regen SL. (2004) Probing the hydration of lipid bilayers using a solvent isotope effect on phospholipid mixing. *Langmuir* 20:8958-8960

31. Balasubramanian S, Pal S, Bagchi B (2002) Hydrogen-Bond Dynamics near a Micellar Surface: Origin of the Universal Slow Relaxation at Complex Aqueous Interfaces. *Phys Rev Lett* 89:115505-1

32. Klauda JB, Venable RM, Freites JA, O'Connor JW, Tobias DJ, Monragon-Ramirez C, Vorobyov I, MacKerrel AD Jr, Pastor, RW. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *J Phys Chem B* 2010, 114:7830-7843

33. Oostenbrink C, Villa A, Mark A, van Gunsteren W (2004) A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation: The GROMOS Force-Field Parameter Sets 53A5 and 53A6. *J Comput Chem* 25:1656-1676

34. Kukol A (2009) Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins. *J Chem Theory Comput* 5:615-626

35. Jorgensen W, Maxwell D, Tirado-Rives J (1996) Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J Am Chem Soc* 118:11225-11236

36. Price MLP, Ostrovsky D, Jorgensen WL (2001) Gas-Phase and Liquid-State Properties of Esters, Nitriles, and Nitro Compounds with the OPLS-AA Force Field. *J Comput Chem* 22:1340–1352

37. Briggs JM, Nguyen TB, Jorgensen WL (1991) Monte Carlo Simulations of Liquid Acetic Acid and Methyl Acetate with the OPLS Potential Functions. *J Phys Chem* 95:3315-3322

38. Murzyn K, Pasenkiewicz-Gierula M. (1999) Construction and optimisation of a computer model for a bacterial membrane. *Acta Biochim Polon* 46:631-639

39. Murzyn K, Róg T, Blicharski W, Dutka M, Pyka J, Szytula S, Froncisz W (2005) Influence of the disulfide bond configuration on the dynamics of the spin label attached to cytochrome *c*. *Proteins* 62:1088-1100

40. Róg T, Murzyn K, Hinsen K, Kneller G (2003) nMoldyn: a program package for neutron scattering oriented analysis of molecular dynamics simulations. *J Comp Chem* 24:657-667

41. Jura J, Jura J, Murzyn K, Węgrzyn P, Zarębski A (2005) Cloning and characterization of 5' upstream promoter region of rat WAP gene. *BBA-Gene Struct Expr* 1727:58-64

42. Mizgalska D, Węgrzyn P, Murzyn K, Kasza A, Koj A, Jura J, Jastrząb B, Jura J (2009) Interleukin-1-inducible MCPIP protein has structural and functional properties of RNase and participates in degradation of IL-1 beta mRNA. *FEBS Journal* 276:7386-7399

43. Murzyn K, Zhao W, Karttunen M, Kurdziel M, Róg T (2006) Dynamics of water at membrane surfaces: Effect of headgroup structure. *Biointerphases* 1(3):98-105

44. Róg T, Murzyn K, Karttunen M, Pasenkiewicz-Gierula M (2008) Nonpolar interactions between trans-membrane helical EGF peptide and phosphatidylcholines, sphingomyelins and cholesterol. Molecular dynamics simulation studies. *J Pept Sci* 14:374-382

45. Pasenkiewicz-Gierula M, Baczyński K, Murzyn K, Markiewicz M (2012) Orientation of lutein in a lipid bilayer – revisited. *Acta Biochim Polon* 59:115-118

46. Sledz P, Zheng HP, Murzyn K, Chruszcz M, Zimmerman MD, Chordia MD, Joachimiak A, Minor W. (2010) New surface contacts formed upon reductive lysine methylation: Improving the probability of protein crystallization. *Protein Sci* 19:1395-1404

47. Porebski PJ, Klimecka M, Chruszcz M, Nicholls RA, Murzyn K, Cuff ME, Xu XH, Cymborowski M, Murshudov GN, Savchenko A, Edwards A, Minor W (2012) Structural characterization of *Helicobacter pylori* dethiobiotin synthetase reveals differences between family members. *FEBS Journal* 279:1093-1105

48. Banas M, Zabieglo K, Kasetty G, Kapinska-Mrowiecka M, Borowczyk J, Drukala J, Murzyn K, Zabel BA, Butcher EC, Schroeder JM, Schmidtchen A, Cichy J. (2013) Chemerin is an antimicrobial agent in human epidermis. *PLOS ONE* 8:e58709

49. Majchrzak-Gorecka M, Majewski P, Grygier B, Murzyn K, Cichy J (2016) Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a multifunctional protein in the host defense response. *Cytokine Growth Factor Rev* 28:79-93

50. Szczelina R, Murzyn K (2014) DMG-α – A Computational Geometry Library for Multimolecular Systems *J Chem Inf Model* 54:3112-3123

51. Pasenkiewicz-Gierula M, Baczyński K, Markiewicz M, Murzyn K. (2016) Computer modelling studies of the bilayer/water interface. *BBA-Biomembranes* 1858:2305-2321