

## ویژگی های ترمودینامیک پارتیشن (تقسیم بندی) غشاء- آب در یک لیوپیتید آمفیفیلک: یک اثر آبگریز آنتالپی-محور

### چکیده

برای روشن کردن نیروی محرکه برای اثر آبگریزی که لیوپروتئین های آمفیفیلک را بین آب و غشاء تقسیم می کند، یک تجزیه و تحلیل ترمودینامیکی اتمی مفصل را در یک بلوک هپتاپتید H-ras اصلاح شده چربی سه برابر (ANCH) در آب و در یک چربی های دولایه دارای دو لایه لیپیدی DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) انجام دادیم. با ترکیب رویکردهای حلال مکانیکی و زنجیره مولکولی با یک روش بهبود یافته برای محاسبه آنتروپی جسم حل شده، یک انرژی آزاد انتقال کلی  $^{-1} 13 \text{ kcal mol}^{-1}$  را به دست آوردیم؛ این مقدار دارای سازگاری کیفی با تغییرات انرژی آزاد به دست آمده از یک پتانسیل محاسبه نیروی متوسط و مشاهدات تجربی غیر مستقیم است. تغییرات در انرژی های آزاد حلال پوشی و سازماندهی مجدد ساختاری ANCH، نامطلوب هستند، در حالی که فعل و انفعالات ANCH-DMPC- به خصوص واندروالس- به نفع جاگذاری هستند. این نتایج با یک اثر آبگریز آنتالپی-محور سازگار است، و موافق با داده های کالریمتری قبلی در مورد تقسیم بندی غشاء دیگر آمفیلی ها. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل ساختاری و آنتروپی مولکولی گروه های تولیدشده-دینامیک نشان می دهد که انتخاب کنفورماسیونی (انطباقی) می تواند نقشی را در وارد نمودن غشاء پتیدهای چربی-اصلاح شده و پروتئین ها ایفا کند که تاکنون به آن توجه نشده است.

انتقال ترکیبات غیرقطبی (آبگریز یا متنفر از-آب) به غشاهای چربی معمولاً به اثر آبگریزی نسبت داده می شود. در اصل (1)، فرض می شود که نیروی محرکه برای اثر آبگریز آنتروپیک است. دلیلش این است که چون تغییر آنتروپی،  $\Delta S$ ، با انتقال مولکول های کوچک غیر قطبی مانند بنزن و هگزان از فاز خالص به آب، بزرگ و در دمای اتاق منفی است؛ آنتالپی مربوطه،  $\Delta H$ ، حدوداً صفر یا تنها اندکی منفی است. تفسیر مولکولی مرسوم این مشاهده اینست که ورود مولکول ناقطبی در آب در الگوی پیوند-هیدروژنی مولکولهای آب پیرامون اختلال ایجاد می کند. در صورت عدم وجود فعل و انفعالات آب-جسم حل شده برای جبران این اثر، فعال و انفعال قوی تر در بین مولکولهای آب در اطراف جسم حل شده موجب نظم به اصطلاح " اندرون ها " (1)، " کوه های یخ " (2)، و یا " خوشه های آشفته " (3) می شود. انتشار و سازماندهی مجدد این مولکول های آب منظم به محض انتقال جسم حل شده به فاز خالص، منشاء آنتروپیک اثر آبگریز (1) را توضیح می دهد. این فرآیند انتقال توسط بستگی قوی تغییر ظرفیت گرمایی ( $\Delta C_p$ ) به ورود حرارت مشخص می شود، که می تواند توسط مصرف گرما برای "ذوب کردن" کوه یخ توضیح داده شود. به طور مشابه، ارتباط بین شکل گیری واسطه ها (مانند آب-غشاء) و اثر آبگریز برای اجسام حل شده بزرگ توسط جابجایی مولکول های آب به دور از سطوح جسم حل شده غیر قطبی (4) و یا خیسی زدایی (5) توصیف شده است.

تقسیم مولکول های کاملاً آبگریز به مدل و یا غشاهای زیستی سازگار با این تصویر " کلاسیک " از اثر آبگریز است، یعنی، اثرات حلال، موجب ورود می شوند. در واقع، انتقال یک سری از تری پپتیدهای آبگریز به غشاء چربی با آنتروپی مثبت بزرگ (مطلوب) و آنتالپی صفر (تقریبی) (6) مرتبط است. در مقابل، انتقال مولکول های آمفیفیلیک از فاز آبی به غشای لیپیدی می تواند به صورت آنتالپی یا آنتروپی محور باشد. به عنوان مثال، اگر چه آنتروپی بر انرژی آزاد انتقال غشاء دیبوکاین بی حسی موضعی باردار مثبت غالب است، همان آزمایشات کالریمتری، اثرات آبگریز آنتالپی-محور را برای 2-(p-toluidinyl)naphthalene-6-sulfonate رنگی حساس-پتانسیل یافتند. هدایت غشاء موجب القا تترافنیلبورات آنیون و آملودیپین مسدود کننده کانال (7)  $Ca^{2+}$  می شود.

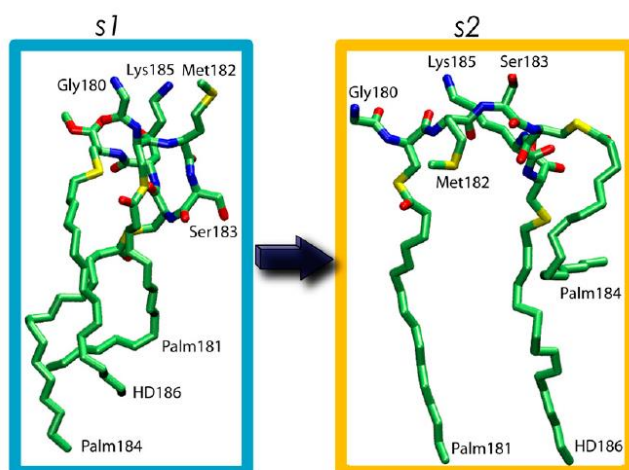
این داده ها نشان می دهند که نیروی محرکه برای اثر آگریز مسئول تقسیم شدن ترکیبات آمفیفیلیک بین آب و غشاء نمی تواند به عنوان نیروی ناشی از سازماندهی مجدد حلال عمومیت یابد. اثرات آب گریز آنتالپی-محور نیز در ارتباطات دارو-پروتئین (8) یافت شده اند. همچنین تفسیر متعارف اثر آگریز توسط دشواری تمایز بین جسم حل شده و اثرات حلال پیچیده می شود. اولاً، انرژی جاذبه واندروالس (VDW) بین مولکولهای غیرقطبی در فاز مایع می تواند آنتالپی هیدراتاسیون (9) را بپوشاند. به عنوان مثال، در حالی که آنتالپی کلی دمای اتاق در ارتباط با انتقال یک مولکول بنزن به آب نزدیک به صفر است، انرژی فعال و انفعال vdW اندازه گیری شده توسط گرمای تبخیر، مثبت است  $(\sim +6 \text{ kcal mol}^{-1})$ ، که آنتالپی هیدراتاسیون منفی (10) را نشان می دهد. دوماً، به مدت طولانی اذعان شده است که جداسازی نسبت حلال و حل شونده در آنتروپی توسط روش های تجربی (8,11) و یا با تکنیک های محاسباتی رایج (12) مشکل است. در واقع، تخصیص آنتروپی انتقال به سازماندهی مجدد آب تنها زمانی معتبر است که سازماندهی مجدد جسم حل شده ناچیز باشد، که معمولاً چنین نیست.

برای روشن کردن این مسائل، ما به صراحت نسبت های مرتبط با حل شونده و حلال در انرژی آزاد انتقال (و یا ورود) یک لیپوپتید آمفیفیلیک در یک چربی های دولایه دارای دو لایه لیپیدی 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) را محاسبه نمودیم. یک هپتاپتید چربی-اصلاح شده سه برابر به نمایندگی از بلوک غشای H-ras (ANCH) به عنوان یک سیستم مدل استفاده شد. H-ras متعلق به خانواده Ras GTPases است که تنظیم کننده های بسیار مهم سیگنالینگ سلولی هستند. آنها واسطه تکثیر، رشد، و آپوپتوز سلولی هستند. زمانی که به غشاء متصل شده باشند، به خصوص کاسبرگ داخلی غشای پلاسمایی. هدف قرار دادن غشاء از طریق اصلاح (های)-چربی پس-انتقالی (13) به دست می آید. در H-ras، این شامل فارنیسیلاسیون (که در اینجا توسط گروه هگزادسیل، HD مدل سازی شده است) در سیگنال CaaX ترمینال-C (a) معمولاً نشان دهنده آلیفاتیک و X نشاندهنده هر اسید آمینه است) و پس از آن پالمیتویلاسیون (Palm) دو سیستمین مجاور می شود (شکل 1). توزیع زنجیره های جانبی قطبی و باردار (SER-183 و Lys-185) نسبت به 182-Met غیر قطبی و گروه های چربی-اصلاح شده (Palm181، Palm184 و HD186)، به ANCH، کاراکنتر آمفیفیلیک می دهد. با این حال،

انعطاف پذیری دم های چربی بلند آن و عدم وجود یک هندسه تعریف شده در محلول, ANCH را در مقایسه با اشکال اصلی آمفیفیلیک اتصال دهنده-غشاء رایج، مانند مارپیچ های- $\alpha$  (14)، پپتیدهای حاوی-TRP ((15) و منابع آن)، و یون های آبگریز حامل- حلقه (7) منحصر به فرد می سازد.

ANCH یک سیستم جالب به خودی خود و به عنوان یک مدل برای مطالعه نیروی محرکه اثر آبگریز برای تقسیم بندی غشاء پپتید (LIPO) است. اولاً، یک درک مفصل از ویژگی های ترمودینامیک ورود غشای آن از نظر بیولوژیک و دارویی با پیامدها برای درمان سرطان مهم است. دوم، اندازه متوسط آن، نمونه برداری گسترده از فضای پیکربندی توسط شبیه سازی های کامپیوتری را میسر می سازد. سوم، ساختار و ویژگی های دینامیک ANCH متصل شده-غشایی، و همچنین مکانیسم ورود و پتانسیل مرتبط با نیروی متوسط (PMF)، قبلاً با جزئیات (16-18) شناخته شده است. اطلاعات تجربی قابل توجه نیز در دسترس هستند (19-21). به علاوه، ساختار سنتی و آمفی فیلیسیته منحصر به فرد ANCH، یک چشم انداز تازه را برای یک مسئله قدیمی ارائه می دهد.

ما از شبیه سازی های دینامیک مولکولی (MD) برای تولید گروه های ساختاری ANCH در آب و در یک چربی های دولایه دارای دو لایه لیپیدی DMPC استفاده نمودیم. این گروه ها برای ارزیابی کمیت های ترمودینامیکی استفاده شدن. آنروپی پیکربندی جسم حل شده توسط یک تجزیه و تحلیل شبه هارمونیک کامل اصلاح شده برای عدم هارمونی ها و ارتباطات دو به دو و آنروپی های خارجی توسط یک رویکرد توزیع احتمال مورد ارزیابی قرار گرفت. انرژی های داخلی و حلال پوشی توسط مدل های حلال پوشی مکانیکی و زنجیره مولکولی برآورد شد. ما دریافتیم که اثر آبگریز مسئول انتقال آب به غشاء ANCH، آنتالپی محور است. علاوه بر این، یک تجزیه و تحلیل ساختاری و آنروپی ترکیبی در ANCH نشان می دهد که انتخاب کنفورماسیونی (انطباقی) می تواند نقش مهمی در اتصال غشاء ایفا کند.



شکل 1 ساختار ANCH در آب (حالت  $S1 = 1$ ، سمت چپ) و در یک چربی های دولایه دارای دو لایه لیپیدی DMPC (حالت  $S2 = 2$ ، سمت راست). این مدلها نشان دهنده مراکز خوشه اول از شبیه سازی های  $S1$  و  $S2$  (به متن مراجعه کنید). کربن (سبز)، اکسیژن (قرمز)، نیتروژن (آبی)، و گوگرد (زرد).

## روش ها

توزیع تعادل ANCH در دمای  $T = 310 \text{ K}$  در این کار) بین آب و غشاء را می توان با قرار دادن انرژی آزاد،  $\Delta G_{\text{ins}}$  توصیف نمود؛ (معادله 1)،

$$\Delta G_{\text{ins}} = \Delta H - T\Delta S. \quad (1)$$

تغییرات در آنتالپی ( $\Delta H$ ) و آنتروپی ( $\Delta S$ ) ناشی از تغییرات در فعال و انفعال و سازماندهی مجدد اتم در داخل و بین ANCH هپتاپپتید،  $p$ ، غشاء،  $m$ ، و آب،  $w$  (معادله 2) است.

$$\Delta G_{\text{ins}} = (\Delta H - T\Delta S)^p + (\Delta H - T\Delta S)^{p-m} + (\Delta H - T\Delta S)^m + (\Delta H - T\Delta S)^{w\text{-related}}. \quad (2)$$

هر کدام از این شرایط را می توان با نمونه برداری از پیکربندی های جسم حل شده و حلال در حالت اولیه ANCH در آب ( $S1$ ) و حالت نهایی در غشاء ( $S2$ ، شکل 1) محاسبه نمود. در اینجا، فرض می شود که عبارت سوم ناچیز

است (جزئیات بخش شبیه سازی را ببینید) و ورود پپتید توسط یک فرایند دو مرحله ای توصیف می شود (معادله 3):



اولین گام،  $p \rightarrow p^*$  نشاندهنده انطباق تطابقی  $p$  با شکل خود در غشا،  $p^*$  است. دومین گام،  $p^* \rightarrow p^* m$  شامل ارتباط  $p^*$  و  $m$  است. توجه داشته باشید که تمام کمیت های ترمودینامیک را می توان در یک مرحله تک شامل حالات نهایی  $(p \rightarrow p^* m)$  محاسبه نمود. مزیت طرح دو-مرحله ای اینست که هزینه انرژی آزاد سازماندهی مجدد تطابقی پپتید،  $\Delta G_{\text{reo}}^{p \rightarrow p^*}$  را می توان به طور جداگانه از انرژی آزاد ارتباط محاسبه نمود،  $\Delta G_{\text{ass}}^{p^* \rightarrow p^* m}$ . مجموع آنها برابر با انرژی آزاد کلی ورود  $\Delta G_{\text{ins}}^{p \rightarrow p^* m}$  است (معادله 4).

$$\Delta G_{\text{ins}}^{p \rightarrow p^* m} = \Delta G_{\text{reo}}^{p \rightarrow p^*} + \Delta G_{\text{ass}}^{p^* \rightarrow p^* m} \quad (4)$$

انرژی پتانسیل میان-ANCH و غشا-ANCH متوسط-گروهی و انرژی های آزاد حلال پوشی غیرقطبی و قطبی متناظر با استفاده از رویکرد مساحت سطح قابل دسترسی حلال Poisson Boltzmann مکانیکی مولکولی (MM-PBSA) (22,23) منطبق با یک سیستم غشایی محاسبه شدند.

### MM-PBSA

در طرح MM-PBSA،  $\Delta G_{\text{reo}}^{p \rightarrow p^*}$  و  $\Delta G_{\text{ass}}^{p^* \rightarrow p^* m}$  را می توان به صورت زیر نوشت (معادلات 5 و 6):

$$\Delta G_{\text{reo}}^{p \rightarrow p^*} = (\Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{PB}} + \Delta G_{\text{SA}} + T\Delta S_{\text{cnf}})^{p \rightarrow p^*} \quad (5)$$

$$\Delta G_{\text{ass}}^{p^* \rightarrow p^* m} = (\Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{PB}} + \Delta G_{\text{SA}} + \Delta G_{\text{lip}} + T\Delta S_{\text{tr}})^{p^* \rightarrow p^* m}. \quad (6)$$

انرژی پتانسیل  $\Delta E_{MM}^{x \rightarrow y}$  (که در آن  $x \rightarrow y$  نشاندهنده  $p \rightarrow p^*$  یا  $p^* \rightarrow p^*m$ ) است) از انرژی های کووالانس (پیوند، زاویه، دی هدرال،  $(\Delta E_{MM}^{cov})$  و غیرپیوندی و فعل و انفعال الکتروستاتیک  $(\Delta E_{MM}^{ele})$  تشکیل شده است

$$\Delta E_{MM}^{x \rightarrow y} = \Delta E_{MM}^{cov} + \Delta E_{MM}^{vdW} + \Delta E_{MM}^{ele}. \quad (7)$$

هر یک از این عبارات از یک تفاوت متوسط گروهی انرژی های میدان نیروی CHARMM متناظر در s1 و s2 به دست آمد که بدون حذف عبارات غیرپیوندی محاسبه شدند.

روش Poisson Boltzmann (PB) در ویژگی های الکتروستاتیک کوانتوم برای حلال پوشی الکتروستاتیکی استفاده شد  $\Delta G_{PB}^{x \rightarrow y}$  (معادله 8).

$$\Delta G_{PB}^{x \rightarrow y} = \Delta G_{ff}^{x \rightarrow y}(\epsilon_s, \epsilon_w), \quad (8)$$

که در آن  $\Delta G_{ff}^{x \rightarrow y}(\epsilon_s, \epsilon_w)$ ، انرژی میدان واکنش، انرژی آزاد انتقال یک مولکول از یک محیط با دی الکتریک  $\epsilon_s$

به یک محیط با ثابت دی الکتریک  $\epsilon_w$  است. ماژول PBEQ برنامه (25) CHARMM برای حل معادله PB

خطی (توسط روش آرام سازی پی در پی) در یک شبکه مکعبی  $229 \text{ \AA}^3$  استفاده شد. درون یابی سه خطی پیش

فرض برای توزیع بار و تخمین Debye-Huckel برای نقاط مرزی (با شرایط مرزی متناوب XY برای غشا) استفاده

شد. مرز دی الکتریکی درون  $\pm 0.5 \text{ \AA}$  از سطح اتمی صاف شد. چربی های دولایه دارای دو لایه لیپیدی به عنوان

یک اسلب دی الکتریکی با ضخامت هیدروفوبیک  $\sim 25 \text{ \AA}$  در نظر گرفته شد. ثوابت دی الکتریکی برای آب

$(\epsilon_w)$  و غشا/ANCH  $(\epsilon_s)$  به ترتیب 80 و 2 در نظر گرفته شدند. یک غلظت نمک رقیق 0.015 M با یک

شعاع Stren  $2 \text{ \AA}$  و یک شعاع پروب  $1.4 \text{ \AA}$  استفاده شدند.

حلال پوشی غیرقطبی  $\Delta G_{SA}^{x \rightarrow y}$ ، با استفاده از تغییر در مساحت سطح قابل دسترسی حلال (SASA) و یک ضریب تنش سطحی آب-خلا ( $\gamma_{vw}$ ) برابر با  $0.0054 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  محاسبه شد (معادله 9, Gorfe and Jelesarov (26) و مراجع در آن را ببینید)

SASA با برنامه CHARMM و شعاع پروب  $1.4 \text{ \AA}$  محاسبه شد که در آن غشا به عنوان یک مقوله تک در نظر گرفته شد که هندسه آن توسط لیپیدهای تشکیل دهنده تعریف می شود. توجه داشته باشید که  $G_{PB}^{x \rightarrow y}$  و  $G_{SA}^{x \rightarrow y}$  حاوی هردوی اثرات آنتروپیک و آنتالپیک ناشی از فعل و انفعالات آب-آب، آب-ANCH و غشا-آب می شوند.

رویکرد MM-PBSA به طور گسترده ای در محاسبات انرژی آزاد پیوند پروتئین (22,23)، پروتئین-DNA (26) و پروتئین-مولکول کوچک و نیز آزمایشات اسکن-آلن (26) استفاده شده است. رویکرد PB که توسط SA یا به طور جداگانه تکمیل می شود نیز برای تخمین انرژی های حلالپوشی پیوند غشایی پتیدهای مدل و پروتئین ها استفاده شده است (29-32). MM-PBSA به نمونه برداری گسترده از فضاهای پیکربندی نیاز دارد. بنابراین، علاوه بر تخمین های ذاتی در مدل های کوانتوم، نمونه برداری انطباقی، نقشی حیاتی را در محدود کردن دقت MM-PBSA بازی می کند. به طور مثال، اینکه آیا شبیه سازی های جداگانه برای راکتانت ها و ترکیب یا یک راکتانت تک برای ترکیب، توافق بهتری با آزمایش فراهم می کند یا خیر، هنوز نامشخص است (22,23,28,33). ما از دو شبیه سازی MD آب صریح 70 نانوثانیه با ANCH در آب و در غشا استفاده نمودیم.

### جزئیات شبیه سازی

یک مدل ساختاری ANCH، ساخته شده که قبل از (17,18) در یک جعبه  $56.5 \times 40.7 \times 38.9 \text{ \AA}^3$  حاوی 2642 مولکول آب و یک یون  $\text{Cl}^-$  حل شد. بعد از تنظیم سیستم ها از طریق چرخه های مینیمم سازی و متعادل سازی پس از پروتکل های استاندارد (به طور مثال، Gorfe و Caflisch (34) را ببینید)، یک شبیه سازی



تولید با برنامه (35) NAMD تحت همان شرایط شبیه سازی های قبلی (16-18) انجام شد. میدان نیروی CHARMM27 (24) با دمای ثابت (310 K)، فشار نرمال و مساحت سطح قطعی استفاده شد. ویژگی های الکتروستاتیک Ewald مش ذره کامل، یک قطع  $12 \text{ \AA}$  برای فعل و انفعالات vdW، یک قطع  $14 \text{ \AA}$  برای به روزسازی فهرست غیرپیوندی، الگوریتم SHAKRE، و یک گام زمانی 2 fs در تمام شبیه سازی ها استفاده شدند. یک شبیه سازی پتید در آب برای 70 نانوثانیه اجرا شد و گروه حاصل، حالت s1 را نشان داد. یک شبیه سازی 20 نانوثانیه (17) ANCH در یک چربی های دولایه دارای دو لایه لیپیدی لیپیدهای DMPC 216 به 70 نانوثانیه گسترش یافت و حالت s2 را نشان داد. در هر مورد، تثبیت ساختاری بین 5 و 10 نانوثانیه ای (16-18) به دست آمد اما فعل و انفعالات میان غشایی و ANCH- غشایی به تکامل تا زمان 35 نانوثانیه ادامه داد. بنابراین، تمام به جز اولین ساختارهای 10 نانوثانیه ای (که در هر پیکوئانیه نمونه برداری شدند) برای محاسبات آنتروپی جسم حل شده استفاده شدند، اما تنها 35 نانوثانیه (نمونه برداری شده در هر 10 پیکوئانیه برای MM و SA، و هر 100 پیکوئانیه برای PB گرانت) برای محاسبات MM-PBSA.

توجه داشته باشید که (i) ANCH در حالت s2 به طور ساختاری مشابه با یک لیپید DMPC است (شکل 1)؛ و (ii) یک لیپید تک از کاسبرگ حاوی ANCH برداشته شد (17,18)، در نتیجه، ورود پتید به طور چشمگیری، ساختار تعادلی چربی های دولایه دارای دو لایه لیپیدی را مغشوش نمی کند (برای جزئیات، (17) Gorfe et al. را ببینید) که نشان می دهد که نسبت  $(\Delta H - T\Delta S)^m$  برای Gins را می توان نادیده گرفت.

### آنتروپی جسم حل شده و انرژی های آزاد اغتشاش غشایی

تخمین زده شد که آنتروپی پیکربندی (با داخلی) جسم حل شده،  $\Delta S_{\text{cnf}}^{\text{p} \rightarrow \text{p}^*}$  که شامل آنتروپی های ارتعاشی و انطباقی می شود، بر اساس یک تحلیل شبه هامورنیک کامل با اصلاحات برای عدم هارمونیسیتته ها و وابستگی های جفت جفت (36) می شود. برآورد حد-بالایی آنتروپی شبه هامورنیک  $(S_{\text{qm}}^{\text{h}})$  با استفاده از آنتروپی برنامه (37)

محاسبه شد. اصلاحات آن برای عدم هارمونی ها در حالات شبه هارمونی ها ( $\Delta S_{cl}^{ah}$ ) و برای ارتباطات (فراخطی) و جفت جفت در میان حالات ( $\Delta S_{cl}^{pc}$ ) در سطح کلاسیک ارزیابی شدند که در (36) تفصیل شده است. این عبارات، افزودنی هستند.

$$T\Delta S_{cnf}^{p \rightarrow p^*} = T\Delta S_{qm}^h + T\Delta S_{cl}^{ah} + T\Delta S_{cl}^{pc}. \quad (10)$$

توجه داشته باشید که  $\Delta S_{cl}^{pc}$  و  $\Delta S_{cl}^{ah}$  با در نظر گرفتن هر دو تفاوت ها بین حالات s1 و s2 و اصلاحات برای مقدار  $S_{qm}^h$  مطلق (36)، در حقیقت،  $\Delta\Delta S_{cl}^{ah}$  و  $\Delta\Delta S_{cl}^{ah}$  هستند. همین روش اخیراً برای سیستم ها با ماهیت های شیمیایی مختلف (38-42) به کار برده شده است. آنتروپی های پیکربندی دم لیپید تک همانند (38) Baron et al. محاسبه شدند.

آنتروپی خارجی (یعنی، افت درجات آزادی چرخشی و انتقالی ANCH بر اساس پیوند غشایی،  $T\Delta S_{tr}^{p^* \rightarrow p^*m}$ ) بر اساس انتگرالگیری عددی توزیعات احتمال نرمالسازی شده،  $p(q)$ ، در انتقال و چرخش جسم-صلب ANCH در s2 (28,43) ارزیابی شد،

$$T\Delta S_{tr}^{p^* \rightarrow p^*m} = RT \left( \ln \left( \frac{C^0}{8\pi^2} \right) - \int p(q) \ln p(q) dq \right). \quad (11)$$

$C^0$ ، غلظت استاندارد است و  $q$ ، مختصات کارتیزین یا زاویه ای را نشان می دهد.

انرژی آزاد آشفته گی غشا،  $\Delta G_{lip}^{p^* \rightarrow p^*m}$  به شرح زیر برآورد شد. ساختار لیپیدهای  $v = 44$  DMPC به محض ورود ANCH آشفته شد، زمانی که  $10 \text{ \AA}$  به عنوان طول چسبیدگی (17) استفاده شد. این آشفته گی توسط تغییر متوسط در پارامتر مرتبه جهتی لیپیدهای متصل شده از حجم مشخص شده است. ( $\Delta S_D \approx 0.04$ ). همراه با  $S_D^0 (\sim 0.2)$  یک چربی های دولایه دارای دو لایه لیپیدی DMPC خالص،  $\Delta S_D$  را می توان برای برآورد بر اساس یک نسخه ساده شده از یک عبارات ناشی از (44) Jähnig استفاده نمود.

$$\Delta G_{lip}^{p^* \rightarrow p^*m} = -\mu v \left( \frac{\Delta S_D}{S_D^0} \right)^2, \quad (12)$$

که در آن  $\mu = 0.27 \text{ kcal mol}^{-1}$  از گرمای نهفته در هر مولکول لیپید در گذار فاز ( $Q = 5.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) و یک عامل دمای نظری (44)  $1/160$  استنتاج می شود.

### نتایج و بررسی

برای مشخص کردن نیروی محرکه برای تقسیم بندی ANCH بین آب و غشا، انرژی آزاد ورود ( $\Delta G_{ins}$ ) به نسبت های آنتروپی/آنتالپی و حل شونده/حلال تجزیه شد. نتایج (جدول 1) نشان می دهند که ورود غشایی توسط آنتالپی فعل و انفعال هدایت می شود ( $\Delta E_{MM} \approx -136 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) و با انرژی های آزاد حلالپوشی ( $\Delta G_{PB} + \Delta G_{SA} \approx +87 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) و نیز توسط آنتروپی جسم حل شده ( $T\Delta S \approx +36 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) مخالفت می شود. انرژی آزاد کلی حاصل ورود ( $\sim -13 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) از نظر کمیتی موافق با برآوردها از محاسبات PMF ( $\sim -30 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) و مشاهدات آزمایشی غیرمستقیم (16,45) ( $\sim -26 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) است. این مقدار نیز قابل مقایسه با هزینه انرژی آزاد استخراج یک لیپید DMPC از یک چربی های دولایه دارای دو لایه لیپیدی است که توسط یک محاسبه PMF اخیر (46) مشخص شده است.

### انطباق تطابقی پتید

بهای سازماندهی دوباره ANCH،  $\sim 59 \text{ kcal mol}^{-1}$  در انرژی آزاد است ( $\Delta G_{reo}^{p^* \rightarrow p^*}$ ، جدول 1). منابع اصلی  $\Delta G_{reo}^{p^* \rightarrow p^*}$  نامطلوب، آنتروپی پیکربندی ( $-T\Delta S_{cnf}^{p^* \rightarrow p^*} \approx 31 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) و افت فعل و انفعالات vdW است ( $\Delta E_{MM}^{vdW}$ ، Fig. 2 A). فعل و انفعالات الکتروستاتیک میان-ANCH ( $\Delta E_{MM}^{ele}$ )، یک انرژی مطلوب میانه را ارائه نمود، در حالیکه عبارات کووالانس ( $\Delta E_{MM}^{cov}$ ) قابل چشمپوشی است (شکل 2A). این نتایج می تواند به واسطه ساختار غالب ANCH منطقی شوند (شکل 1). در ANCH, s1، به طور نسبی با زخم دم های لیپید هیدروفوبیک آن

حول یکدیگر، فشرده است. در s2, ANCH, یک تطابق گسترده با دم های لیپید باز شده را اتخاذ نمود (اشکال 1 و 3). این گذار فشرده-به-گسترده  $p \rightarrow p^*$  را می توان توسط یک مساحت سطح قابل دسترسی حلال میانگین گروهی تعیین نمود که برای p,  $\sim 1700 \text{ \AA}^2$  و  $\sim 2500 \text{ \AA}^2$  برای  $p^*$  است. بنابراین،  $\Delta E_{MM}^{vdW}$  نامطلوب و حلالپوشی غیرقطبی  $\sim 5 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $\Delta G_{SA}$ ) عمدتاً ناشی از تلفات در فعل و انفعالات vdW و مواجهه آب با گروه های CH2 بودند. گروه های قطبی، در هر دوی s1 و s2، با حلال مواجه شدند که نسبت الکتروستاتیک متوسط (فعال و انفعال و حلالپوشی) را توضیح می دهد. بالاترین نسبت برای  $\Delta G_{reo}^{p \rightarrow p^*}$  از آنتروپی پیکربندی (شکل 2A) رخ می دهد که پیش بینی قبلی ما از انرژی آزاد سازماندهی دوباره ANCH را که در آنتروپی غالب است پشتیبانی می کند (16).

علامت مثبت  $-T\Delta S_{cnf}^{p \rightarrow p^*}$ ، قضاوت صحیح در مورد ارتباط آرام سازی ساختاری با یک افزایش در آنتروپی را نفی می کند. هرچند، این سازگار با این مفهوم است که چربی های دولایه دارای دو لایه لیپیدی، فضای پیکربندی دردسترس برای ANCH، از جمله توسط اجرای جهت گیری های خاص در میان اثرات دیگر کاهش می دهد (17,18,47,48). برای داشتن یک درک کیفی از این موضوع، ما دوباره  $-T\Delta S_{cnf}^{p \rightarrow p^*}$  را برای هر یک از دم های لیپید Palm181, Palm184, و HD186 و نیز برای ستون فقرات پتید محاسبه نمودیم. ما همچنین توزیع احتمال  $(p(r))$  فاصله های انتها-به-انتها را محاسبه نمودیم، یعنی، آخرین فاصله بین اولین متیل و اتم های کربن متیلن در دم های لیپید و اولین و آخرین اتم های  $\text{Ca}$  از ستون فقرات. نتایج، در Palm184، متوسط، در Palm181 متوسط و در HD186 بزرگ است. مقادیر  $-T\Delta S$  متناظر (تک-زنجیره) منعکس کننده این تغییرات (به ترتیب: 1, 2, and 9  $\text{kcal mol}^{-1}$ ) است. در مورد ستون فقرات،  $p(r)$  نمایشدهنده یک توزیع

چاه-دوبل مشابه تقریبی در هر دوی s1 و s2 است که دوباره توسط مقدار  $\sim 1 \text{ kcal mol}^{-1} -T\Delta S$  منعکس می شود. همین نتایج کیفی را می توان توسط مقایسه توزیع ساختار با هم قرار داده شده یا انحرافات متناظر مربع-میانگین ریشه استنتاج نمود (RMSD, شکل 3). این داده ها نشان می دهند که ورود چربی های دولایه دارای

دو لایه لیپیدی DMPC موجب کاهش فضای انطباقی در دسترس برای ANCH می شود و بنابراین، کاهش در آنتروپی حل شونده را توضیح می دهد.

### جدول 1 نسبت ها برای انرژی آزاد انتقال غشا-آب ANCH ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )

فرایند	انرژی پتانسیل ( $\Delta E_{MM}$ )	حلالپوشی ( $\Delta G_{PB} + \Delta G_{SA}$ )	آنتروپی غیرآب ( $\Delta E_{MM}$ )	انرژی آزاد (مجموع)
$p \rightarrow p^*$	24.3 (8)	4.1 (7)*	30.6 (9) <sup>†</sup>	59.0
$p^* \rightarrow p^*m$	-160.8 (65)	83.3 (16)*	5.5 (1)	-72.0
$p \rightarrow p^*m$	-136.5 (66) <sup>‡</sup>	87.4 (19) <sup>‡</sup>	36.1 (10)	-13.0

برای اختصار،  $\Delta G_{lip}^{p^* \rightarrow p^*m} \approx 0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  در  $-T\Delta S$  گنجانده شده است، هرچند شامل یک مولفه آنتالپی

نیز می شود. خطاهای آماری به دست آمده بعد از متوسط گیری بلوک طی بخش های 7 نانوثانیه ای تغییرات در انرژی ها به صورت انحرافات استاندارد داده شده اند (که در پرانتز نشان داده شده اند).

\*خطا به صورت مجموع مقادیر انحراف استاندارد در  $\Delta G_{PB}$  و  $\Delta G_{SA}$  منتشر شد.

<sup>†</sup> خطای متوسط روی  $T\Delta S$  از یک تحلیل خطای عددی برای  $S_{qm}^{th}$  بعد از انتظار خطا روی تفاوت به دست آمد ( ماده تکمیلی، شکل S1 را ببینید).

<sup>‡</sup> انحراف استاندارد به طور مستقیم از گذار  $p \rightarrow p^*m$  محاسبه شد.

### ورود پیتید

کاهش در فضای پیکربندی و افت در فعل و انفعالات ANCH vdW، توسط تغییر انرژی فعال و انفعال غشای-

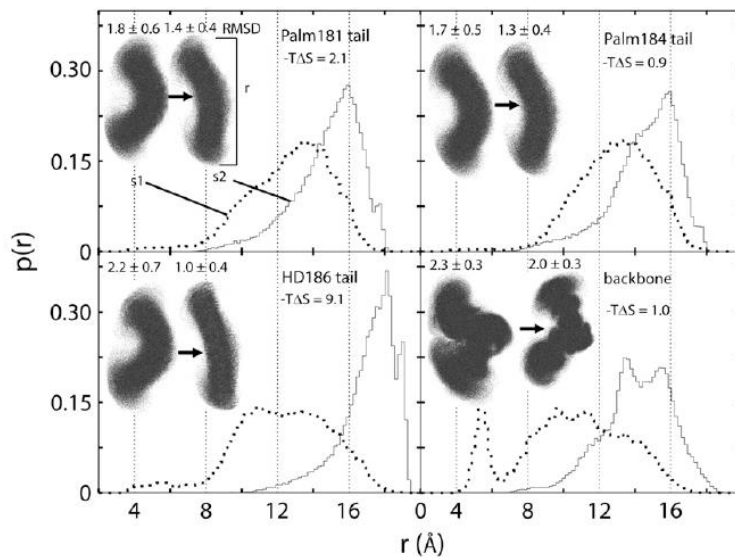
ANCH  $\sim -161 \text{ kcal mol}^{-1}$  جبران می شود. فعل و انفعالات vdW در دم های لیپید ANCH و زنجیره

جانبی MET-182 با لیپیدهای DMPC، سه چهارم انرژی پتانسیل را فراهم نمود؛ بقیه از فعل و انفعالات کولمب

تامین می شود (شکل 2B). حلالپوشی الکتروستاتیک ( $\Delta G_{PB}$ )، که در حدود دو برابر دامنه  $\Delta E_{MM}^{ele}$  است) با

پیوند مخالفت می کند. مقدار  $\Delta G_{SA}$  به طور نسبی کوچک, اما مطلوب است. همراه با نسبت های کوچک از انتروپی خارجی, انرژی آزاد ارتباط کلی  $(\Delta G_{ass}^{p* \rightarrow p*m})$ ,  $\sim -71 \text{ kcal mol}^{-1}$  است.

نقش  $\Delta E_{MM}^{vdW}$  را می توان از این حقیقت درک نمود که (i) به اندازه 5-7 کنتاکت vdW اولیه منجر به یک ورود سریع و خودبخودی پپتید کلی می شود (16,18,47) و (ii) پیشرفت ورود غشا با یک افزایش پایدار اتصالات vdW همراه می شود (16,17).  $\Delta E_{MM}^{ele}$  مطلوب, منعکس کننده فعل و انفعالات پیوند-هیدروژن شامل گروه های آمید و زنجیره های جانبی Ser183/Lys-185 با اتم های اکسیژن فسفات/گلیکول DMPC (16-18) است. اثرات مخالف  $\Delta G_{SA}$  و  $\Delta G_{PB}$  سازگار با انتقال گروه های قطبی از آب به ناحیه واسطه ای است که از نظر فعالیت, نسبت به انتقال گروه های غیرقطبی به هسته DMPC, هزینه بر است. افت انتروپی چرخشی/انتقالی نیز به اندازه  $\sim 5 \text{ kcal mol}^{-1}$  با این پیوند مخالفت می کند؛  $\sim 4 \text{ kcal mol}^{-1}$  از آن, از محدودیت ها در درجات آزادی چرخشی است. دامنه انتروپی انتقالی کوچک است, زیرا تنها درجه آزادی ابعاد-Z (در طول عمود بر غشا) محدود می شود. در حقیقت, سیار بودن جانبی ANCH در آب و در غشا مشابه است. به طور مثال, ضریب دوبعدی خود-انتشار ANCH,  $10 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$  در  $1 \text{ s}$  و  $7.9 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$  در  $2 \text{ s}$  است. انرژی آزاد برآورد شده آشفته گی غشایی, ناشی از اختلال لیپیدهای DMPC که نزدیک به ANCH یا لیپیدهای متصل شده (17) هستند, نیز بسیار کوچک است ( $\sim 0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). یک مقدار مشابه قبل از (44) برآورد شده است.



شکل 3. نمودارهای توزیع احتمال ( $p(r)$ ) در  $s1$  (خط نقطه دار) و  $s2$  (خط توپر) از فواصل انتها-به-انتها بین اولین و آخرین اتم های کربن دم های لیپید ANCH (Palm181) (سمت چپ بالا), Palm184 (بالا سمت راست), HD186 (پایین سمت چپ) و بین اتم های  $Ca\alpha$  باقیمانده های 180 و 186 (ستون فقرات, پایین سمت راست). ساختارهای متناظر به صورت نقاط نشان داده شده اند (آغاز:  $s1 \rightarrow s2$ ) که نشاندهنده تصاویر فوری 1-پیکوثانیه ای جداسازی شده جمع شده روی فریم اول است. متوسط RMSD های مورد نظر در بالای هر مدل ساختاری به تصویر کشیده شده اند. توجه داشته باشید که  $-TAS$  نشاندهنده تفاوت انرژی آزاد (ناشی از آنتروپی پیکربندی) بین حالات  $s1$  و  $s2$  است.

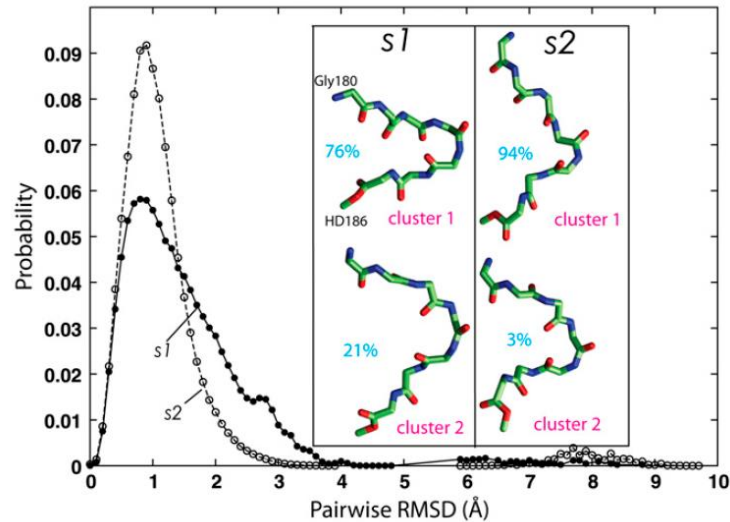
### ویژگی های دینامیک ستون فقرات, انتخاب تطابقی را پیشنهاد می دهد

محاسبات کنونی, یک مکانیزم اتصال القایی را فرض نمودند, یعنی انطباق تطابقی ANCH بعد از اتصال غشایی رخ می دهد. در یک کار قبلی (16), ما پیش بینی نمودیم که ورود غشا با انرژی آزاد غالب-آنتروپی سازماندهی دوباره پیتید مورد مخالفت قرار می گیرد. بر اساس توافق بین محاسبات PMF و برآوردهای آزمایشی, پیش بینی نمودیم که  $\Delta G_{\text{reo}}^{\text{p} \rightarrow \text{p}^*}$  کوچک خواهد بود (16). هرچند آنها, حالت نهایی  $s2$  را به طور مشترک داشتند. حالت اولیه در کار قبلی, جایی بین  $s1$  و  $s2$  بود که مانع مقایسه مستقیم با داده های کنونی می شود. هرچند, مقدار بزرگ  $\Delta G_{\text{reo}}^{\text{p} \rightarrow \text{p}^*}$

محاسبه شده در اینجا به یک توضیح نیاز دارد. توزیع RMSD جفت جفت و تحلیل خوشه ای (به استثنای 10 نانوثانیه اول)، دیدگاه های جالبی را در مورد این موضوع فراهم می کند (شکل 4).

ساختار ستون فقراتی ANCH در s2 توسط یک توزیع گاوسی باریک و تیز از RMSD جفت جفت و یک جداسازی متوسط بین اعضای گروه با  $1 \text{ \AA}$  مشخص می شود. گروه متناظر در s1 توسط یک توزیع غیرگاوسی مشخص می شود. خوشه بندی این ساختارها منجر به یک خوشه اصلی در s2 (94%) و دو تا در s1 (76% و 21%) شد. به طور قابل توجهی، پرجمعیت ترین خوشه در رتبه دوم در s1 نشاندهنده یک تطابق گسترش یافته است که دقیقاً از پرجمعیت ترین خوشه در s2 تقلید می کند. یک خروجی جالب از این نتیجه، این امکان است که ورود غشایی شامل انتخاب تطابقی می شود. این به نوبه خود نشان می دهد که انعطاف پذیری ذاتی ANCH در آب موجب تولید منطبق کننده هایی می شود که با افت انرژی کمتر، به غشا تقسیم بندی می شوند. انتخاب تطابقی، یک زمینه رایج در ارتباطات پروتئین-پروتئین، پروتئین-لیگاند و پروتئین-اسید نوکلئیک است (49-51)، اما فرض می شود که غشاها اغلب به طور غیرگزینشی به پروتئین ها/پپتیدها شکل می دهند. داده های ما نشان می دهند که انتخاب تطابقی می توانند حداقل نقشی جزئی را در انتقال ANCH به غشا بازی کنند. در چنین موردی، مقدار  $\Delta G_{\text{teo}}^{\text{P} \rightarrow \text{P}^*}$  برآورد شده در اینجا باید یک حد بالاتر از جریمه انرژی را در ارتباط با گذار  $\text{P} \rightarrow \text{P}^*$  نشان دهد که سازگار با محاسبات PMF قبلی ماست (16).





شکل 4 ویژگی های ساختار ستون فقرات ANCH. (نمودار اصلی) توزیعات نرمال شده RMSD دو به دو (قاب به قاب) بین ساختارهای نمونه برداری شده در هر 10 پیکوثانیه. (آغاز) ساختارهای مرکز-خوشه دو خوشه اول به دست آمده توسط خوشه بندی بر اساس RMSD-با قطع  $2 \text{ \AA}$ ، که تقریباً نقطه واگرایی یک توزیع نرمال است (که توسط WORDOM (62) محاسبه شده است). توجه داشته باشید که اگر چه 10 نانوثانیه اول داده ها از مطالعه حذف شدند، چند ساختار در اطراف  $8 \text{ \AA}$  به دور از تطابقات غالب خوشه بندی می شوند. کد رنگ: کربن به رنگ سبز، اکسیژن به رنگ قرمز، نیتروژن به رنگ آبی.

#### دینامیک دم های لیپید، از انتخاب تطابقی پشتیبانی می کند

سازماندهی دوباره تطابقی دم های لیپید ANCH، حیاتی است، زیرا به محض انتقال از آب، آنها باید راست و مستقیم شوند و با شکل لیپیدهای میزبان تطابق یابند. این مورد از توزیعات فواصل انتها-به-انتها مشهود است (شکل 3). هر یک از دم های لیپید زمانی کشیده می شود که وارد چربی های دولایه دارای دو لایه لیپیدی شود. گروه هگزادسیل (HD186)، تحت بزرگترین تغییر قرار گرفت، با طول زنجیره متوسط  $\sim 18 \text{ \AA}$  در  $s2$  در مقایسه با  $\sim 12 \text{ \AA}$  در  $s1$ . این کار اجازه داد تا HD186 به عمق بیشتر وارد شود و تعداد بالاتری از اتصالات vdW را

با لیپیدهای DMPC داشته باشد (16,17). تغییرات طول زنجیره به طور نسبی برای Palm181 و Palm184 کوچک هستند اما هنوز چشمگیر می باشند.

مشاهدات آزمایشی غیرمستقیم نشان می دهند که حذف هر لیپید ANCH، ویژگی های جنبشی اتصال غشا را مدوله (زیر و بم) می کند (45,52,53). آزمایشات میکروسکوپی کلی نشان داد که حوزه سیستولیک H-ras، بسیار کمتر از N-ras اصلاح شده-لیپید یا متغیرهای H-ras با Palm181 و Palm184 حذف شده می باشد (21). علاوه بر این، محاسبات PMF نشان داد که به محض اتصال غشا، حذف دم های لیپید منجر به افزایش سریع در PMF، می شود و اینکه بزرگترین نسبت برای انرژی آزاد ورودی از HD186 می آید که پس از آن Palm181 و Palm184 قرار دارند (A. A. Gorfe and J. A. McCammon، منتشر نشده). همانطور که در بالا بحث شد، گسترش HD186 به تنهایی،  $\sim 9 \text{ kcal mol}^{-1}$  را در آنروپی پیکربندی به همراه دارد (اگر به عنوان یک مقوله جداگانه در نظر گرفته شود). پیشنهاد ما اینست که به جای پرداخت جریمه آنروپی، ساختارها با لیپیدهای گسترش یافته قبلی (تقاطع در  $p(r)$  در  $s1$  و  $s2$  را ببینید) به طور گزینشی و خودبخودی توسط مکانیزم انتخاب تطابقی وارد شوند.

### ملاحظات فیزیکی-شیمیایی و آزمایشات اولیه

برخی از اصولی که برای اجسام حل شده هیدروفوبیک خالص برقرار است و در مقدمه نشان داده شده است، برای مولکول های حاوی برخی از واحدهای هیدروفیلیک کاربرد دارد (4). هرچند، جاسازی هیدروفیلیک و هیدروفوبیک، پیکربندی های مولکولی را محدود می کند که منجر به اثرات آنروپیک اضافی می شود (4). بنابراین انرژی آزاد انتقال مولکول های آمفی فیلیک به یک غشا با یک قسمت داخلی روغنی دارای دو نسبت اصلی است. اولی، نسبت انرژی آزاد سر هیدروفیلیک است که به نفع واسطه آب- چربی های دو لایه دارای دو لایه لیپیدی است. نسبت خالص این اثر برای انرژی آزاد کلی می تواند وابسته به پلاریته (یا محتوای بار) و شکل گروه های سر تغییر یابد. دومی، نسبت انرژی آزاد ناشی از انتقال بخش هیدروفوبیک به قسمت داخلی روغنی غشا است. نسبت خالص این

انرژی آزاد همیشه مطلوب است و توسط اندازه نسبت هیدروفوبیک ماده حل شونده مدول می شود که برای پروتئین های لیپدیده، با طول (مثلاً فارنسیل به ازای گرانیل گرانیل) و اشباع (مثلاً فارنسیل به ازای پالمیتویل) در اصلاح (های) چربی تغییر می کند. برخلاف این تفاوت ها، انرژی های آزاد ناشی از گروه های-سر و دم های هیدروفوبیک دارای مولفه های آنتالپی و آنتروپی هستند. داده های ارائه شده در این کار، یک نقش غالب را به آنتالپی منسوب می کنند. میزان عمومیت این نتیجه چقدر است؟

دو مورد کرانی را در نظر بگیرید: یک سر هیدروفیلیک بسیار باردار حاوی یک دم لیپید هیدروفوبیک کوچک و یک سر هیدروفیلیک باردار تک حاوی یک دم هیدروفوبیک بزرگ. ANCH غشای K-Ras، که حاوی هشت باقیمانده Lys می شود اما تنها یک گروه فارنسیل تک، نشاندهنده اولی است. H-ras ANCH این مطالعه نشاندهنده دومی است. چون فعل و انفعالات غالب H-ras ANCH بین باقیمانده های Lys و گروه های سر لیپید (باردار) هستند، انرژی الکتروستاتیک، فرآیند انتقال غشا-آب را دیکته می کند. نسبت های فعل و انفعالات vdW و سازماندهی دوباره حلال ناشی از دم لیپید تک می تواند چشمگیر باشد، اما غالب نیستند. بنابراین، فعل و انفعالات آنتالپی جذاب، نه اثرات سازماندهی دوباره یا آنتروپیک حلال، گنجاندن غشای K-Ras را هدایت می کند.

بنابراین تفاوت بین K-ras و H-ras اینست که آیا منبع آنتالپی، الکتروستاتیک است یا vdW. از نظر قطبیت، بیشتر اصلاحات لیپید بین این دو مورد قرار می گیرد. بنابراین، به استثنای ممکن لیپیداسیون های حامل حلقه کمیاب (مانند گلیسرولاسیون)، ورود غشای به بیشتر لیپوپروتئین ها می تواند آنتالپی محور باشد. این نتیجه مطابق با آنتالپی های اگزوترمیک اندازه گیری شده برای جفت های غشا/لیپوپروتئین زیر است: گلوکاگون / (54) DMPC، غشاهای ترانس کاربامیلاز هدایت کننده پپتید/فسفولیپید (55)، (56) A-II/DMPC آپولیپوپروتئین و -1,2-A-I، dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl- Glycerol (DMPG) آپولیپوپروتئین. دیگر انتقال های غشای آنتالپی-محور آمفی فیل ها شامل 2-(p-toluidinyl)naphthalene-6-sulfonate رنگی حساس به-

(7)  $Ca^{2+}$  پتانسیل، هدایت غشایی القاکننده تترآفنیلبورات آنینون و آملودیپین بلاکر (مسدودکننده) کانال

می شود.

به طور خلاصه، نتایج در جدول 1 و شکل 2 (به مقادیر انحراف استاندارد توجه داشته باشید) باید به عنوان اولین تلاش به سوی محاسبه انرژی آزاد ورود غشای یک لیپوپپتید در نظر گرفته شوند که در آن تمام نسبت های مرتبط به طور صریح محاسبه شده اند. محاسبات انرژی آزاد به طور آشکارا مشکل هستند (58-61)، حتی برای سیستم های نسبتاً کوچک. بنابراین، یک تصویر ترمودینامیک مفصل و سالم از نظر کیفی، نه یک تصویر کمیتی، پیش بینی شد. نوسانات بزرگ و کاهش ها بین تعداد بسیار بزرگ به طور کلی، دقت کمیتی نتایج را محدود می کند. برخی از بهبودها روی داده های کنونی توسط کاربرد اصل انتخاب تطابقی و/یا استفاده از یک لایه دوپل در محاسبات PB (برای ناحیه هسته و واسطه چربی های دو لایه دارای دو لایه لیپیدی) ممکن می شود.

برخلاف این محدودیت ها، انرژی آزاد کلی محاسبه شده ورود به طور معقولی نزدیک به انرژی به دست آمده از یک محاسبه PMF و از مشاهدات آزمایشی غیرمستقیم است. بنابراین به ما اجازه داد تا ویژگی های ترمودینامیک تقسیم بندی غشایی لیپوپروتئین ها را با تجزیه انرژی آزاد انتقال به نسبت های حلال/حل شونده و آنتالپی/آنتروپی مشخص نماییم. چنین تجزیه انرژی آزاد نشان داد که اثر هیدروفوبیک مسئول انتقال غشای ANCH، آنتالپی-محور است. تغییرات در انرژی های آزاد سازماندهی دوباره حلالپوشی و پپتید به نفع اتصال غشا نیست. منبع اصلی آنتالپی مطلوب، فعل و انفعال vdW غشا-ANCH است. بنابراین، نتایج ما، دیدگاه های ساختاری و دینامیک اتمیسیته برای مشاهدات کالری متریکی قبلی در مورد نقش آنتالپی در تقسیم بندی غشای آمفی فیل ها را فراهم می کند (پاراگراف قبلی را ببینید).

علاوه بر این، یک تحلیل تطابقی و آنتروپی مفصل نشان داد که رفتار دینامیک ANCH در آب، تشکیل تطابقات گسترش یافته را میسر می سازد که بدون جریمه انرژی چشمگیر وارد غشا می شوند. یک نتیجه قابل توجه این مشاهده اینست که انتخاب تطابقی می تواند نقشی مهم در اتصال غشایی لیپوپروتئین ها ایفا کند، همانطور که در ارتباط بیومولکول های دیگر این کار را می کند.

## REFERENCES

1. Tanford, C. H. 1980. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. Wiley, New York.
2. Frank, H. S., and M. W. Evans. 1945. Free volume and entropy in condensed systems. 3. Entropy in binary liquid mixtures—partial molal entropy in dilute solutions—structure and thermodynamics in aqueous electrolytes. *J. Chem. Phys.* 13:507–532.
3. Nemethy, G., and H. A. Scheraga. 1962. Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. 1. A model for thermodynamic properties of liquid water. *J. Chem. Phys.* 36:382–400.
4. Chandler, D. 2005. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature*. 437:640–647.
5. Hua, L., X. H. Huang, P. Liu, R. H. Zhou, and B. J. Berne. 2007. Nanoscale dewetting transition in protein complex folding. *J. Phys. Chem. B*. 111:9069–9077.
6. Jacobs, R. E., and S. H. White. 1989. The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface—implications for the insertion of transbilayer helices. *Biochemistry*. 28:3421–3437.
7. Seelig, J., and P. Ganz. 1991. Nonclassical hydrophobic effect in membrane binding equilibria. *Biochemistry*. 30:9354–9359.
8. Homans, S. W. 2007. Water, water everywhere—except where it matters? *Drug Discov. Today*. 12:534–539.
9. Privalov, P. L., and S. J. Gill. 1988. Stability of protein-structure and hydrophobic interaction. *Adv. Protein Chem.* 39:191–234.
10. Privalov, P. L., and S. J. Gill. 1989. The hydrophobic effect—a reappraisal. *Pure Appl. Chem.* 61:1097–1104.
11. Cooper, A. 1999. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:557–563.
12. van Gunsteren, W. F., D. Bakowies, R. Baron, I. Chandrasekhar, M. Christen, X. Daura, P. Gee, D. P. Geerke, A. Glattli, P. H. Hunenberger, M. A. Kastenholz, C. Oostenbrink, M. Schenk, D. Trzesniak, N. F. van der Vegt, and H. B. Yu. 2006. Biomolecular modeling: goals, problems, perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45:4064–4092.
13. Hancock, J. F., A. I. Magee, J. E. Childs, and C. J. Marshall. 1989. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*. 57:1167–1177.
14. Huang, H. W. 2006. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1758:1292–1302.
15. Babakhani, A., A. A. Gorfe, J. Gullingsrud, J. E. Kim, and J. Andrew McCammon. 2007. Peptide insertion, positioning, and stabilization in a membrane: insight from an all-atom molecular dynamics simulation. macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* 4:187–217.
26. Gorfe, A. A., and I. Jelesarov. 2003. Energetics of sequence-specific protein-DNA association: computational analysis of integrase Tn916 binding to its target DNA. *Biochemistry*. 42:11568–11576.
27. Zhou, Z., M. Bates, and J. D. Madura. 2006. Structure modeling, ligand binding, and binding affinity calculation (LR-MM-PBSA) of human heparanase for inhibition and drug design. *Proteins*. 65:580–592.
28. Swanson, J. M., R. H. Henchman, and J. A. McCammon. 2004. Revisiting free energy calculations: a theoretical connection to MM/PBSA and direct calculation of the association free energy. *Biophys. J.* 86:67–74.
29. Ben-Tal, N., and B. Honig. 1996. Helix-helix interactions in lipid bilayers. *Biophys. J.* 71:3046–3050.
30. Ben-Shaul, A., N. Ben-Tal, and B. Honig. 1996. Statistical thermodynamic analysis of peptide and protein insertion into lipid membranes. *Biophys. J.* 71:130–137.
31. Ben-Tal, N., A. Ben-Shaul, A. Nicholls, and B. Honig. 1996. Free-energy determinants of alpha-helix insertion into lipid bilayers. *Biophys. J.* 70:1803–1812.
32. Roux, B., T. Allen, S. Berneche, and W. Im. 2004. Theoretical and computational models of biological ion channels. *Q. Rev. Biophys.* 37:15–103.
33. Wang, W., O. Donini, C. M. Reyes, and P. A. Kollman. 2001. Biomolecular simulations: recent developments in force fields, simulations of enzyme catalysis, protein-ligand, protein-protein, and pro-

*Biopolymers*. 85:490–497.

16. Gorfe, A. A., A. Babakhani, and J. A. McCammon. 2007. Free energy profile of H-ras membrane anchor upon membrane insertion. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46:8234–8237.
17. Gorfe, A. A., A. Babakhani, and J. A. McCammon. 2007. H-ras protein in a bilayer: interaction and structure perturbation. *J. Am. Chem. Soc.* 129:12280–12286.
18. Gorfe, A. A., M. Hanzal-Bayer, D. Abankwa, J. F. Hancock, and J. A. McCammon. 2007. Structure and dynamics of the full-length lipid-modified H-ras protein in a 1,2-dimyristoylglycero-3-phosphocholine bilayer. *J. Med. Chem.* 50:674–684.
19. Abankwa, D., A. A. Gorfe, and J. F. Hancock. 2007. Ras nanoclusters: molecular structure and assembly. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18:599–607.
20. Rotblat, B., I. A. Prior, C. Muncke, R. G. Parton, Y. Kloog, Y. I. Henis, and J. F. Hancock. 2004. Three separable domains regulate GTP-dependent association of H-ras with the plasma membrane. *Mol. Cell Biol.* 24:6799–6810.
21. Roy, S., S. Plowman, B. Rotblat, I. A. Prior, C. Muncke, S. Grainger, R. G. Parton, Y. I. Henis, Y. Kloog, and J. F. Hancock. 2005. Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling. *Mol. Cell Biol.* 25:6722–6733.
22. Wang, J. M., P. Morin, W. Wang, and P. A. Kollman. 2001. Use of MM-PBSA in reproducing the binding free energies to HIV-1 RT of TIBO derivatives and predicting the binding mode to HIV-1 RT of efavirenz by docking and MM-PBSA. *J. Am. Chem. Soc.* 123:5221–5230.
23. Massova, I., and P. A. Kollman. 2000. Combined molecular mechanical and continuum solvent approach (MM-PBSA/GBSA) to predict ligand binding. *Perspectives in Drug Discovery and Design*. 18:113–135.
24. MacKerell, A. D., D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiorcikiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus. 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B*. 102:3586–3616.
25. Brooks, B. R., R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus. 1983. CHARMM: a program for tein-nucleic acid noncovalent interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30:211–243.
34. Gorfe, A. A., and A. Caffisch. 2005. Functional plasticity in the substrate binding site of beta-secretase. *Structure*. 13:1487–1498.
35. Phillips, J. C., R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, and K. Schulten. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26:1781–1802.
36. Baron, R., W. F. van Gunsteren, and P. H. Hunenberger. 2006. Estimating the configurational entropy from molecular dynamics simulations: anharmonicity and correlation corrections to the quasi-harmonic approximation. *Trends in Physical Chemistry*. 11:87–122.
37. Christen, M., P. H. Hunenberger, D. Bakowies, R. Baron, R. Burgi, D. P. Geerke, T. N. Heinz, M. A. Kastenholtz, V. Krautler, C. Oostenbrink, C. Peter, D. Trzesniak, and W. F. van Gunsteren. 2005. The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. *J. Comput. Chem.* 26:1719–1751.
38. Baron, R., A. H. de Vries, P. H. Hunenberger, and W. F. van Gunsteren. 2006. Configurational entropies of lipids in pure and mixed bilayers from atomic-level and coarse-grained molecular dynamics simulations. *J Phys Chem B*. 110:15602–15614.
39. Baron, R., and J. A. McCammon. 2008. (Thermo)dynamic role of receptor flexibility, entropy, and motional correlation in protein-ligand binding. *ChemPhysChem*. 9:983–988.
40. Baron, R., D. Trzesniak, A. H. de Vries, A. Elsener, S. J. Marrink, and W. F. van Gunsteren. 2007. Comparison of thermodynamic properties of coarse-grained and atomic-level simulation models. *ChemPhysChem*. 8:452–461.
41. Pereira, C. S., D. Kony, R. Baron, M. Muller, W. F. van Gunsteren, and P. H. Hunenberger. 2006. Conformational and dynamical properties of disaccharides in water: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* 90:4337–4344.
42. Pereira, C. S., D. Kony, R. Baron, M. Muller, W. F. van Gunsteren, and P. H. Hunenberger. 2006. Conformational and dynamical properties of disaccharides in water: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* 90:4337–4344.
43. Minh, D. D., J. M. Bui, C. E. Chang, T. Jain, J. M. Swanson, and J. A. McCammon. 2005. The entropic cost of protein-protein association: a case study on acetylcholinesterase binding to fasciculin-2. *Biophys. J.* 89:L25–L27.
44. Jahnig, F. 1983. Thermodynamics and kinetics of protein incorporation into membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80:3691–3695.
45. Silvius, J. R., and F. l'Heureux. 1994. Fluorimetric evaluation of the affinities of isoprenylated peptides for lipid bilayers. *Biochemistry*. 33:3014–3022.
46. Tieleman, D. P., and S. J. Marrink. 2006. Lipids out of equilibrium: energetics of desorption and pore mediated flip-flop. *J. Am. Chem. Soc.* 128:12462–12467.
47. Gorfe, A. A., R. Pellarin, and A. Caffisch. 2004. Membrane localization and flexibility of a lipidated ras peptide studied by molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 126:15277–15286.
48. Huster, D., A. Vogel, C. Katzka, H. A. Scheidt, H. Binder, S. Dante, T. Gutberlet, O. Zschornig, H. Waldmann, and K. Arnold. 2003. Membrane insertion of a lipidated ras peptide studied by FTIR, solid-state NMR, and neutron diffraction spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 125:4070–4079.
49. Berger, C., S. Weber-Bornhauser, J. Eggenberger, J. Hanes, A. Pluckthun, and H. R. Bosshard. 1999. Antigen recognition by conformational selection. *FEBS Lett.* 450:149–153.
50. Sauve, S., J. F. Naud, and P. Lavigne. 2007. The mechanism of discrimination between cognate and non-specific DNA by dimeric b/HLH/LZ transcription factors. *J. Mol. Biol.* 365:1163–1175.
51. Bosshard, H. R. 2001. Molecular recognition by induced fit: how fit is the concept? *News Physiol. Sci.* 16:171–173.
52. Shahinian, S., and J. R. Silvius. 1995. Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes. *Biochemistry*. 34:3813–3822.
53. Silvius, J. R., and R. Leventis. 1993. Spontaneous interbilayer transfer of phospholipids: dependence on acyl chain composition. *Biochemistry*. 32:13318–13326.
54. Epanand, R. M., and J. M. Sturtevant. 1981. A calorimetric study of peptide-phospholipid interactions—the glucagon-dimyristoylphosphatidylcholine complex. *Biochemistry*. 20:4603–4606.
55. Myers, M., O. L. Mayorga, J. Entage, and E. Freire. 1987. Thermodynamic characterization of interactions between ornithine transcarbamylase leader peptide and phospholipid bilayer membranes. *Biochemistry*. 26:4309–4315.
56. Massey, J. B., A. M. Gotto, and H. J. Pownall. 1981. Thermodynamics of lipid-protein interactions—interaction of apolipoprotein A-II from human-plasma high-density lipoproteins with dimyristoylphosphatidylcholine. *Biochemistry*. 20:1575–1584.
57. Epanand, R. M., J. P. Segrest, and G. M. Anantharamaiah. 1990. Thermodynamics of the binding of human apolipoprotein A-I to dimyristoylphosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* 265:20829–20832.
58. Gilson, M. K., J. A. Given, B. L. Bush, and J. A. McCammon. 1997. The statistical-thermodynamic basis for computation of binding affinities: a critical review. *Biophys. J.* 72:1047–1069.
59. Simonson, T., G. Archontis, and M. Karplus. 2002. Free energy simulations come of age: protein-ligand recognition. *Acc. Chem. Res.* 35:430–437.
60. Lesyng, B., and J. A. McCammon. 1993. Molecular modeling methods. Basic techniques and challenging problems. *Pharmacol. Ther.* 60:149–167.
61. Jorgensen, W. L. 2004. The many roles of computation in drug discovery. *Science*. 303:1813–1818.
62. Seeber, M., M. Cecchini, F. Rao, G. Settanni, and A. Caffisch. 2007. WORDOM: a program for efficient analysis of molecular dynamics simulations. *Bioinformatics*. 23:2625–2627.