

Vilniaus universiteto  
Fizikos fakulteto  
Cheminės fizikos institutas

Domantas Narkevičius  
FOTOAKTYVAUS MOLEKULINIO JUTIKLIO LAŠTELĖS MEMBRANOJE MODELIS

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Teorinės fizikos ir astrofizikos  
studijų programa

Studentas

Domantas Narkevičius

Leista ginti

2024-05-24

Darbo vadovas

dr. Stepas Toliautas

Instituto direktorius

prof. Darius Abramavičius

Vilnius 2024

# Turiny

Turiny	2
Įvadas	4
1. Teorija	5
1.1. Molekuliniai dažai	5
1.2. Molekuliniai jutikliai	6
1.2.1. FLIM	7
1.2.2. BODIPY molekuliniai jutikliai	8
1.3. Fosfolipidinės membranos	10
1.3.1. Lipidai	10
1.3.2. Membranų funkcijos	10
1.3.3. Membranų sandara	11
1.3.4. Membranos parametrai	12
1.4. Lipidinių membranų klampos jutikliai	13
1.5. Molekulių mechanika	14
1.5.1. Molekulių dinamika	15
1.5.2. Jėgų laukas	15
2. Metodika	17
2.1. Ankstesni darbai	17
2.2. MD programinė ir techninė įranga	18
2.3. Lipidų jėgų laukai	18
2.4. Lipidinės membranos validavimas	19
2.5. BODIPY jėgų laukai	22
2.5.1. <i>gaff</i> ir <i>gaff2</i> jėgų laukai	22
2.5.2. Atomų tipų parinkimas	23
2.5.3. Geometrijos lyginimas	24
2.6. Sistemų paruošimas	25
2.6.1. Jutiklio jėgų laukas: <i>Lipid14</i> sistema	25
2.6.2. Jutiklio jėgų laukas: <i>Lipid21</i> sistemos	26
2.6.3. Sistemos surinkimas	27
2.7. MD ir analizė	28
2.7.1. Jutiklio orientavimasis	28

2.7.2. Difuzijos koeficientas.....	30
3. Rezultatai ir jų aptarimas.....	31
3.1.1. Jutiklio orientavimasis.....	31
3.1.2. Difuzijos koeficientas.....	34
4. Išvados.....	36
Padėka.....	37
Literatūra.....	38
SUMMARY.....	44
1 Priedas.....	45
2 Priedas.....	46
3 Priedas.....	47
4 Priedas.....	48
5 Priedas.....	49
6 Priedas.....	50
7 Priedas.....	53
8 Priedas.....	56
9 Priedas.....	58
10 Priedas.....	61
11 Priedas.....	64

# Įvadas

Vėžiniai susirgimai yra dažnai susiję su ląstelės sandaros bei struktūros pakitimais. Navikų gydymas yra vienas iš sudėtingiausių biochemijos bei medicinos uždavinių, nes vėžinės ląstelės yra struktūriškai pakitusios, tačiau labai panašios į žmogaus sveikas ląsteles. Tie panašumai apsunkina vaistų, kurie selektyviai veiktų tik vėžines ląsteles, kūrimą. Todėl metodai, galintys padėti nustatyti šių ląstelių struktūrinius pakitimus, yra labai aktualūs kuriant naujos kartos priešvėžinius vaistus.

Ląstelės bei dalis jų viduje esančių organelių turi lipidinę membraną. Ji skiria ląstelės išorę nuo vidaus ir suteikia jai formą bei struktūrą, o organelėms leidžia vykdyti specifinių sąlygų reikalaujančias biochemines reakcijas (pvz., mitochondrijose, lizosomose) ar saugoti informaciją (pvz., branduolyje). Membranos gali turėti kelias fazes (būsenas), kurios pasižymi skirtingu elastingumu bei struktūra. Viena iš membranos fazių gali sudaryti lipidų plaustus, per kuriuos ląstelės komunikuoja [1]. Vėžinės ląstelės su sunykusiais lipidų plaustais nebegali priimti signalo apoptozei (užprogramuotai ląstelės mirčiai) [2], todėl lipidų plaustų tyrimas pagelbėtų priešvėžinių vaistų kūrimui.

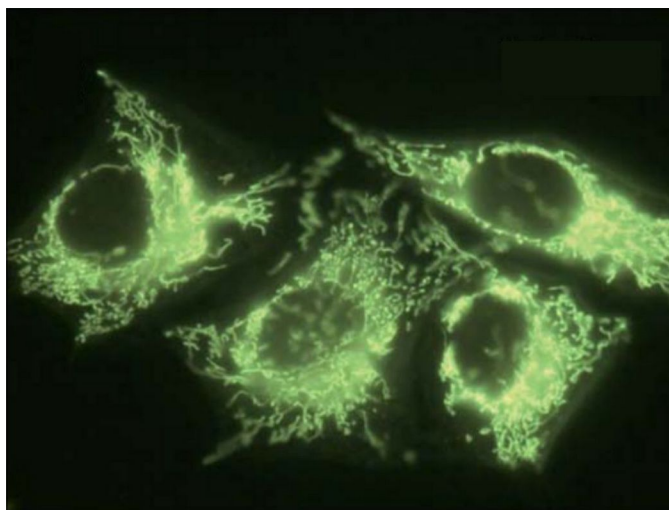
Lipidų plaustų membranoje vizualizacija bei fizikinių parametrų, tokių kaip klampa, poliškumas ar temperatūra, žemėlapių sudarymas yra įmanomas naudojant molekulinis jutiklius. BODIPY (borodipirometeno) klamos jutikliai yra plačiai naudojami matuojant klamos žemėlapius. Tačiau susiduriama su problema, jog jutiklis sunkiai įsiterpia į lipidų plaustus imituojančius darinius dėl tankesnio lipidų išsidėstymo [3]. Modifikuotas naujos kartos BODIPY jutiklis buvo eksperimentiškai tyrinėtas Polita *et al.* darbe [4], tačiau liko neatsakytas klausimas: ar jutiklis iš tiesų matuoja padidėjusią aplinkos klampą, ar tik savo pozicijos pasikeitimą membranoje. Taip pat nėra aišku, dėl ko atsiranda eksperimento metu stebimas biekspontinis fluorescencijos gesimas. Todėl šio magistrinio darbo tikslas – taikant skaičiuojamosios chemijos modelius apskaičiuoti lipidinės membranos su BODIPY jutikliu fizikinius parametrus, kurie leistų įvertinti įterpto jutiklio veikimą. Tikslo įgyvendinimui buvo išskelti šie uždaviniai:

1. Paruošti tinkamą molekulių mechanikos jėgų lauką jutikliui ir lipidinei membranai,
2. Atlikti molekulinės dinamikos simuliaciją esant pastoviai temperatūrai ir slėgiui,
3. Nustatyti jutiklio orientavimąsi lipidinėje membranoje bei apskaičiuoti plokštumos difuzijos koeficientą.

# 1. Teorija

## 1.1. Molekuliniai dažai

Tiriant įvairias mikroskopines sistemas yra siekiama išsiaiškinti tų sistemų savybes bei kaip jos veikia. Dėl įvairių priežasčių įprastiniai optiniai ar elektroniniai mikroskopai ne visados suteikia galimybę stebėti norimus reiškinius be papildomų medžiagų. Į pagalbą yra pasitelkiami įvairūs dažai, kurie specifiškai nudažo norimą sistemos dalį ir tokiu būdu tam tikri procesai ar struktūros tampa pastebimi. Dažymas yra plačiai naudojamas biologijoje bei medicinoje [5], kas leidžia nustatyti ląstelės ir jos dalių – organelių sandarą [6], joje atsirandančius pakitimus esant įvairiems susirgimams, įskaitant vėžinius [7], bei antigenų [8] ar kitokių medžiagų pasiskirstymą. Naudojami dažai ar biomolekulių žymekliai gali būti skirstomi pagal tirpumą, naudojamą metodiką, spalvą ar pagal fotofizikines savybes – dažai būna arba chromoforai, arba fluoroforai. Chromoforai pasižymi šviesos sugertimi tam tikrame bangos ilgio ruože, kas suteikia dažui spalvą. Tokiu būdu nudažytos ląstelės struktūra išryškėja ir tampa matoma po optiniu mikroskopu. Fluoroforai yra visados taip pat ir chromoforai, tačiau šiuo atveju pritaikomos fluorescencinės savybės, o ne sugerties. Fluorescencija yra procesas, kurio metu molekulė, sugėrusi šviesą, po kiek laiko išspinduliuoja didesnio bangos ilgio (žemesnės energijos) fotoną. Skirtumas tarp sugeriamo ir išspinduliuojamo fotono energijos leidžia nudažytą sistemą stebėti kitu bangos ilgiu negu ji yra apšviečiama, o tai didina stebėjimo kontrastą (žr. 1 pav.) ir raišką [9].



1 pav. Aukšto kontrasto HeLa vėžinių ląstelių atvaizdas, gautas jas nudažant fluorescuojančiu molekulinio dažikliu TPE-IQ-20 [3]

Yra siekiama, kad fluoroforas pasižymėtų tokiomis savybėmis: būtų nenuodingas organizmui; sužadintas spinduliuotų raudoną šviesą [10], nes jos sklaida mažesnė skverbiantis pro audinius, kas pagerina darinių matomumą, ir nes tokia šviesa sumažina fluorescencijos spektrų persidengimą dėl ląstelėje esančių biomolekulių autofluorescencijos [11]; turėtų aukštą kvantinę išeią, kas leidžia naudoti mažesnį kiekį dažiklio; ir, svarbiausia, fluoroforas nudažytų norimas ląstelės vietas. Skirtingoms sistemoms yra taikomi skirtingi fluoroforai, todėl yra nuolat ieškoma pranašesnių bei pigesnių dažų.

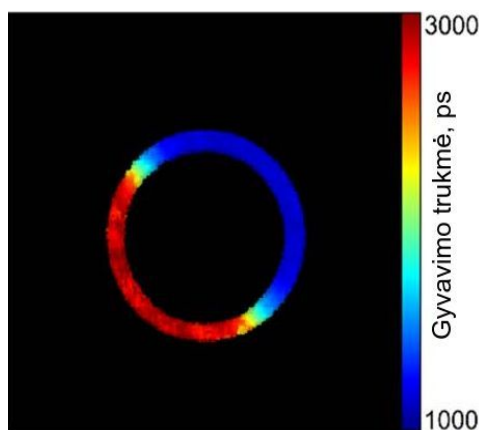
## 1.2. Molekuliniai jutikliai

Atliekant tyrimus bei ieškant naujų vaistų yra aktualu analizuoti ne tik ląstelės struktūrą ir jos pakitimus, bet ir įvairias fizikines savybes: pH, klampą ir t.t. Kadangi ląstelės yra sudarytos iš įvairių organelių, atliekančių skirtingas funkcijas, tai ir fizikinės savybės labai skiriasi skirtingose ląstelės vietose. Net tame pačiame baltyme yra aptinkamos sritys, kurių poliškumas ar pH smarkiai skiriasi [12]. Atliekant fizikinių dydžių matavimus, esant tokiam dideliame ląstelės nehomogeniškumui bei mažiems matmenims, yra būtina naudoti molekulinis jutiklius.

Molekuliniai jutikliai – tai tokios molekulės, kurių sugertis ar fluorescencija pasikeičia keičiantis kokiam nors fizikiniam dydžiui: jonų ar organinių molekulių koncentracijai [13,14], pH [15], temperatūrai [16,17], poliškumui [18,19], klampai [20–22] ir pan. Tokių jutiklių taikymas ląstelėse naudojant mikroskopiją leidžia gauti ne tik struktūrinius atvaizdus, bet ir pasirinkto fizikinio dydžio žemėlapius keičiantis jutiklio kvantinei išeią. Žemėlapių kūrimas remiantis fluorescencijos intensyvumu turi kartinį trūkumą – intensyvumas priklauso nuo molekulinio jutiklio koncentracijos [23], o jo tolygus pasiskirstymas ląstelėse dėl nehomogeniškumo yra beveik neįmanomas. Tokiu būdu matuojant fizikinį dydį susiduriama su rezultatų interpretacijos problema: nėra aišku, ar pakitęs fluorescencijos intensyvumas yra dėl pasikeitusio fizikinio dydžio, ar dėl paties jutiklio koncentracijos nevienodo pasiskirstymo. Intensyvumas taip pat gali pakisti dėl fluorescuojamos šviesos sugerties bei sklaidos.

### 1.2.1. FLIM

Fluorescencijos intensyvumo atvaizdavimo problemų sprendimui yra naudojama fluorescencijos gyvavimo trukmės atvaizdavimo mikroskopija (angl. fluorescence-lifetime imaging microscopy – FLIM). Šis metodas paremtas fluorescuojančių molekulių savybe – gyvavimo trume. Kiekviena sužadintos molekulės būseną yra nestabili, todėl po kiek laiko molekulė (ar atomas) pereina į žemiausios energijos būseną. Šis perėjimas yra vadinamas skatintąja arba savaimine emisijomis [24], kai jo metu yra išspinduliuojami fotonai (-as). Dėl mažų dažų koncentracijų ir mažo sužadintų būsenų kiekio apšviečiamuosiuose biologiniuose dariniuose dominuoja savaiminė emisija. Jos metu sužadinta būseną atsitiktiniu būdu pereina į pagrindinę būseną ir vidutinis laikas, kada sistema būna sužadintoje būsenoje, vadinamas, gyvavimo trukme, kuri fluorescuojantiems dažams būna nanosekundžių eilės; pats procesas yra vadinamas gesimu (*angl.* decay). Molekulinių jutiklių, naudojamų FLIM, gyvavimo trukmė priklauso nuo tam tikro fizikinio dydžio (-ių). Todėl taikant FLIM galima sudaryti gyvavimo trukmės žemėlapius, kurie taikant empirinius sąryšius [25] yra paverčiami į norimo fizikinio dydžio žemėlapius (žr. 2 pav.). Tokiu būdu yra išvengiama rezultatų interpretacijos dviprasmiškumo, nes jutiklio gyvavimo trukmė nepriklauso nuo koncentracijos, kadangi tai yra pačios molekulės savybė.



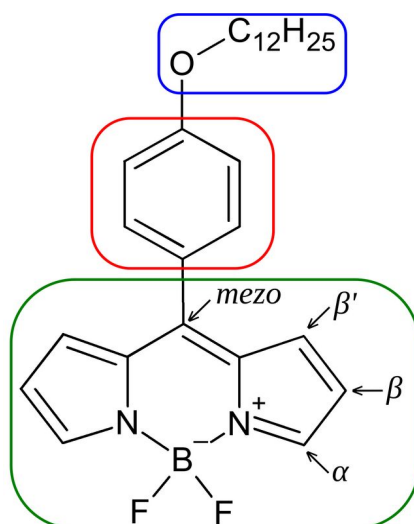
2 pav. **BODIPY-PM klamos jutiklio FLIM atvaizdas liposomoje [4]**

Jutiklis gali turėti daugiau nei vieną spindulinės relaksacijos kelią iš sužadintos būsenos [26]. Fluoroforo intensyvumo priklausomybė nuo laiko yra aprašoma eksponentinio gesimo funkcija, ir kartais ji yra sudaryta iš kelių eksponentinių funkcijų dedamųjų, kurios atitinka unikalios relaksacijos kelius [27]. FLIM matavimams yra

siekiama rasti tokių jutiklių, kurie turėtų monoeksponentinį gesimą, kadangi tai supaprastina matavimų eigą bei interpretaciją [28]. Taip pat, kadangi yra atliekamas gyvavimo trukmės ir pasirinkto dydžio kalibravimas, t. y. sudaroma kalibracinė kreivė, yra siekiama, kad jutiklio gyvavimo trukmė priklausytų tik nuo norimo fizikinio dydžio. Dėl ląstelės nehomogeniškumo galima susidurti su rezultatų interpretacijos problema: nėra aišku, ar gyvavimo trukmė yra pasikeitusi dėl vieno, ar dėl kito fizikinio dydžio [29].

### 1.2.2. BODIPY molekuliniai jutikliai

Molekulinių jutiklių struktūra gali būti labai įvairi, tačiau viena iš plačiau naudojamų klasių yra paremta borodipirometeno (BODIPY) karkasu (žr. 3 pav.). Šie junginiai yra naudojami ir kaip dažai, ir kaip jutikliai. Platus BODIPY taikymas yra paremtas aukšta šių junginių kvantine išeiga, dideliu ekstincijos koeficientu, aukštu cheminiu, šiluminiu bei foto stabilumu bei nesudėtingo cheminės struktūros modifikavimo galimybėmis [30–32].

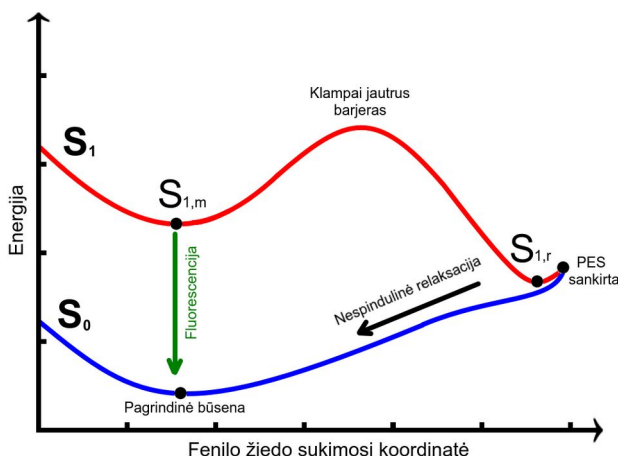


3 pav. **BODIPY-C<sub>12</sub> klamos jutiklio molekulinė struktūra** (žaliu kontūru pažymėtas BODIPY karkasas, raudonu – besisukančioji dalis, mėlynu – inkaras; rodyklėmis pažymėtos karkaso padėtys)

BODIPY jutikliai priklausomai nuo cheminės struktūros gali matuoti temperatūrą, poliškumą bei klampą [29]. Klampa yra labai svarbus ląstelių bei organelių fizikinis dydis, kadangi nuo jo priklauso biocheminių reakcijų greitis, difuzijos koeficientas, kuris nulemia medžiagų pernašos spartą mikroskopiniame lygmenyje. Pakitusi ląstelės klampa yra aptinkama: vėžinėse ląstelėse [33], Alzheimerio liga [34] bei diabetu [35] sergančių



asmenų ląstelių membranose. Vėžio gydymas yra sudėtingas, kadangi vėžinės ląstelės yra panašios į sveikas ir jas atskirti gydant nėra paprasta. Klamos pasikeitimo analizė ląstelėse naudojant BODIPY klamos jutiklius gali pagelbėti kuriant naujus vaistus bei aiškinantis vėžio sukeltus biocheminius pasikeitimus.



4 pav. **Principinė BODIPY klamos jutiklio veikimo schema** (paryškintomis raidėmis pažymėti paviršiai)

BODIPY klamos jutikliai turi dvi molekulos dalis, kurių padėtis viena kitos atžvilgiu pasikeičia vykstant sužaditimui arba relaksacijai. Todėl kiekvienas BODIPY klamos jutiklis yra taip pat vadinamas molekulinio rotoriumi. BODIPY karkasą yra įprasta laikyti stacionariu, o fenilo žiedą *mezo* padėtyje – judančia grupe (žr. 3 pav.). Tiek fenilo žiedas, tiek BODIPY karkasas pagal poreikį gali būti modifikuoti įvairiomis funkcinėmis grupėmis. Sužadintoje būsenoje vyksta relaksacijos kelių konkurencija tarp spindulinio ir nespindulinio gesimo. Spindulinės relaksacijos gyvavimo trukmę aprašo Einšteino koeficientai, o nespindulinės – potencialinis barjeras tarp sužadintų  $S_{1,m}$  ir  $S_{1,r}$  būsenų (žr. 4 pav.), kurios vadinamos atitinkamai metastabilia ir relaksuota būsenomis [36].  $S_{1,m}$  yra pasiekama sužadinant BODIPY molekulę su fenilo žiedu iš pagrindinės būsenos ( $S_0$ ).  $S_{1,r}$  gali būti pasiekta tik per potencialinį barjerą iš  $S_{1,m}$ . Netoli  $S_{1,r}$  būsenos yra  $S_1$  potencialinės energijos paviršiaus (angl. potential energy surface – PES) sankirta su  $S_0$  PES, todėl pasiekus  $S_{1,r}$  įvyksta greita nespindulinė relaksacija atgal į pagrindinę būseną. Jei PES sankirta yra aukščiau negu  $S_{1,r}$  [26], tai fluorescencija bus biekspontinė, nes vysta spindulinė relaksacija tiek iš  $S_{1,m}$ , tiek iš  $S_{1,r}$ . Barjeras tarp  $S_{1,r}$  ir  $S_{1,m}$  atsiranda dėl to, kad BODIPY judančios dalies sukimasis nėra laisvas – jis yra steriškai suvaržytas vandenilių ar

kitokių grupių  $\beta'$  padėtyse (žr. 3 pav.). Barjero aukštį taip pat lemia aplinkos klampa: kuo ji yra didesnė, tuo fenilo žiedui yra sunkiau sukis ir dėl to barjeras padidėja. Esant padidėjusiam barjerui pasikeičia nespindulinio gesimo konstanta, kartu ir gyvavimo trukmė. Tokiu būdu molekulinio lygmeniu yra matuojama klampa naudojant BODIPY klamos jutiklius.

## 1.3. Fosfolipidinės membranos

### 1.3.1. Lipidai

Lipidai yra plati biomolekulių klasė, kurios junginiai yra aptinkami visų rūšių organizmuose. Lipidai yra nepolinės molekulės, todėl pasižymi mažu tirpumu vandenyje. Lipidai yra skirstomi į dvi grupes: turintys riebalų rūgščių fragmentų (pvz., riebalai, fosfolipidai), ir neturintys riebalų rūgščių fragmentų (pvz., steroidiniai junginiai). Riebalų rūgštys – tai tokios karboksirūgštys, kurios aptinkamos gyvuose organizmuose ir turi ilgą anglies grandinėle, gali turėti vieną ar kelias nesočiąsias anglies jungtis. Palmitino sočioji rūgštis yra viena plačiausiai sutinkamų gyvūnuose [37], o oleino mononesočioji rūgštis yra dažnai aptinkama tiek gyvūnuose, tiek augaluose [38].

Fosfolipidai yra vienas iš pagrindinių struktūrinių elementų sudarant organelės ar pačios ląstelės plazminę membraną. Be fosfolipidų, į membranas taip pat įeina membraniniai baltymai bei glikolipidai. Fosfolipidai turi hidrofiliinę galvą, kuri sudaryta iš fosforo rūgšties ir dažnu atveju glicerolio, ir dvi hidrofobines uodegas, kurios gali būti sočiosios arba nesočiosios riebalų rūgštys. Prisijungus prie galvos cholino dariniui susidaro fosfatidilcholinai.

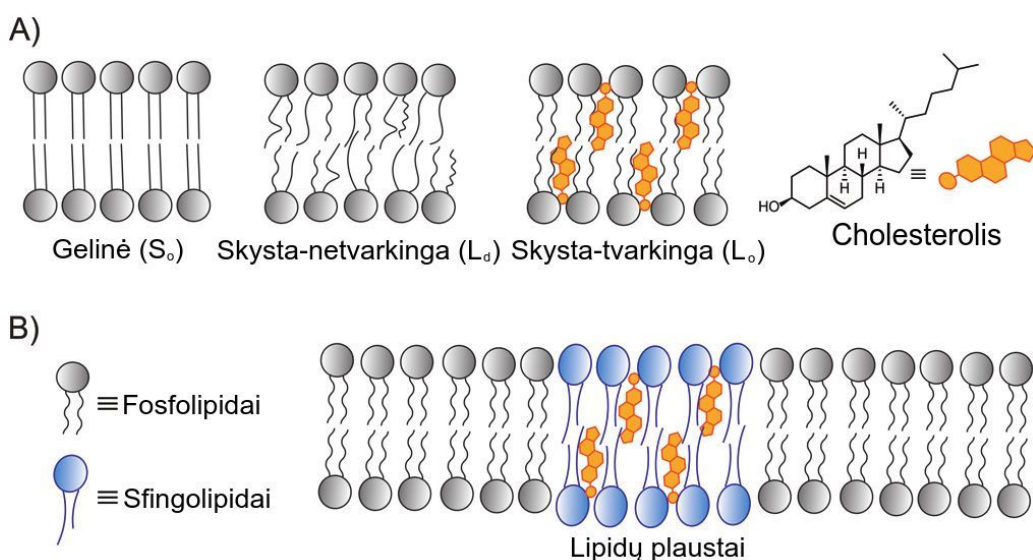
### 1.3.2. Membranų funkcijos

Fosfolipidinės membranos yra neatsiejama ląstelių bei jos viduje esančių organelių dalis. Gyvybė negali egzistuoti visiškoje pusiausvyroje su aplinka, nes tada negalėtų vykti jokios gyvybei būdingos reakcijos. Membranos skiria aplinką nuo ląstelės citozolio – vidinio skysčio. Membranos yra vienintelis kelias tarp ląstelės vidaus ir išorės, todėl per jas yra perduodamos visos maistinės medžiagos, šalinami produktai bei vykdomas informacijos apsikeitimas su aplinka. Didesnių bei mažiau pralaidžių molekulių pernašai yra naudojami membraniniai baltymai bei jonų kanalai.

### 1.3.3. Membranų sandara

Fosfolipidinės membranos pagrindinis komponentas yra fosfolipidai. Jie būna įvairių ilgių bei nesotumo laipsnių. Dėl savo amfifilinių (polinių ir nepolinių) savybių, fosfolipidai išsidėsto dvisluoksniu: nepolinės uodegos nukreiptos į membranos vidų, o polinės galvos į išorę. Toks išsidėstymas yra sąlygotas aplinkos, kadangi tiek citozolis, tiek įprastinė tarpląstelinė terpė yra vandeninė, t. y. polinė. Tarpmembraninė terpė su uodegomis turi poliškumą, panašų į heksano [39].

Fosfolipidinės uodegos turi didelę įtaką membranos sandarai, kadangi uodegos nesotumo laipsnis sąlygoja fosfolipidų išsidėstymo tvarkingumą. Sočiosios riebalų rūgštys fosfolipiduose, neturėdamos jokių dvigubų jungčių anglies grandinėje, gali įgauti pilnai tiesiškai išsidėsčiusių atomų konformaciją. Tai leidžia fosfolipidams, pilnai sudarytiems iš sočiųjų riebalų rūgščių, tankiai išsidėstyti vienas kito atžvilgiu. Tokia fazė, kada visos riebalų rūgščių uodegos tolygiai išsidėsto, yra vadinama geline arba  $S_o$  (*angl.* solid-ordered) faze (žr. 5 pav.). Toks nesočiųjų riebalų rūgščių išsidėstymas fosfolipiduose yra įmanomas tik esant labai žemai temperatūrai. Fosfolipidai su nesočiosiomis riebalų rūgštimis įprastai yra sutinkami  $L_d$  (*angl.* Liquid-disordered) fazėje. Taip pat egzistuoja ir  $L_o$  (*angl.* Liquid-ordered) lipidų fazė, kurioje tarp riebalų rūgščių uodegų įsiterpia cholesterolio dariniai, kurie leidžia išlaikyti ląstelės membranos elastingumą bei fosfolipidų išsidėstymo tvarkingumą esant aukštesnei temperatūrai.



5 pav. Fosfolipidinės membranos fazių (A) ir lipidų plaustų (B) schema [39]

Ląstelės membranos būna heterogeninės, t.y. sudarytos iš lipidų, esančių  $L_d$  fazėje, ir iš lipidų, esančių  $L_o$  fazėje.  $L_o$  fazės lipidai įeina į lipidų plaustų sandarą, į kuriuos taip pat įeina membraniniai baltymai bei sfingolipidai. Lipidų plaustai dalyvauja informacijos apsikeitimo su aplinkinėmis ląstelėmis procese [1] bei reguliuoja ląstelės membranos elastingumą (*angl.* fluidity) [40]. Lipidų plaustų struktūros suardymas užkerta kelią ląstelių (įskaitant vėžinių) apoptozei per signalinių molekulių veikimą [2], todėl lipidų plaustų analizė bei tyrimai yra svarbūs gydant vėžinius susirgimus.

#### 1.3.4. Membranos parametrai

Viena iš pagrindinių fosfolipidines membranas aprašančių parametru yra membranos dvisluoksnio storis, kuris įprastai būna 30 – 35 Å. Nuo šio parametro priklauso įvairių medžiagų, praeinančių per pačią lipidinę membraną, pralaidumo sparta [41]. Membranos storis labiausiai priklauso nuo to, kokia yra jos fazė:  $L_d$  fazėje membranos storis yra mažesnis negu  $S_o$ .

Taip pat lipidinę membraną aprašo plotas, tenkantis vienam fosfolipidui. Šio parametro skaičiavimai yra nesudėtingi, nes membrana yra laikoma plokščia, kadangi jos storis yra daug mažesnis už ląstelės matmenimis. Šis parametras labai priklauso nuo to, kokios yra fosfolipidų riebalų rūgštys ir kokia yra membranos fazė. Fosfolipidinės membranos, sudarytos iš nesočiųjų rūgščių, turi didesnę plotą, tenkantį vienam fosfolipidui, negu membranos sudarytos iš sočiųjų riebalų rūgščių.

Tūris, tenkantis vienam fosfolipidui, kinta priklausomai nuo membranos fazės ir turimų fosfolipidų uodegų. Šis parametras yra ypatingas tuo, jog jį galima išmatuoti tiksliausiai lyginant su kitais parametrais, aprašančiais fosfolipidinę membraną [42]. Yra pastebėta, jog keičiantis fosfolipidų tūriui labiausiai keičiasi uodegų, o ne galvų tūris [42].

Horizontalioji difuzija – tai lipidinių membranų dinaminis fizikinis dydis, pasireiškiantis XY plokštumoje. Fosfolipidai, atliekant kompiuterinius skaičiavimus, yra nukreipjami Z ašies kryptimi. Plokštuma, susidaranti iš fosfolipidų galvų, yra XY plokštuma. Difuzijos koeficientas priklauso nuo temperatūros ir membranos fazės. Fosfolipidų difuzija Z ašimi vykta lėčiau dėl didelio potencinio barjero; kadangi membranos viduje terpė yra nepolinė ir persiorientuojant fosfolipidui reiktų pereiti poline galva per nepolinę kitų fosfolipidų uodegų aplinką. Difuzijos koeficientas priklauso nuo aplinkos klampos; todėl nustačius jutiklio, esančio lipidinėje membranoje, difuzijos koeficientą galima kokybiškai įvertinti klampos

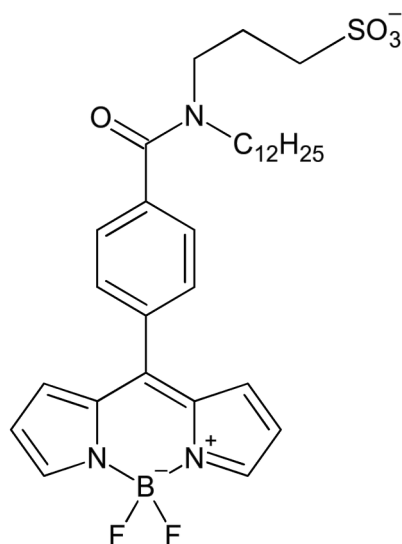
pasikeitimus keičiantis lipidinės membranos fazei, nes  $L_o$  fazės klampa yra didesnė negu  $L_d$  [3].

#### 1.4. Lipidinių membranų klamos jutikliai

Vienas plačiausiai biologiniuose tyrimuose naudojamų klamos jutiklių yra monoeksponentiniu gesimu pasižymintis BODIPY- $C_{10/12}$ , kurį taikant buvo sėkmingai išmatuota klampa mitochondrijose [43], liposomose [44] ir gyvoje ląstelėje [45]. Liposomos – tai iš amfifilinių lipidų sudarytas dirbtinis sferinis darinys, kuris naudojamas vaistų pernašoje bei lipidinių membranų tyrimuose. Matuojant klampą  $L_o$  liposomose su BODIPY- $C_{12}$  buvo pastebėta, kad apie 10–15 % fluorescencijos kinetikos dedamosios nesikeičia keičiantis klampai [3]; tai reiškia, kad dalis BODIPY- $C_{12}$  klamos nematuoja dėl savo pozicijos membranoje, kas yra įmanoma, jei jutiklis lygiagrečiai išsidėsto membranos dviluoksnio sandūroje. Dėl tankesnio fosfolipidų išsidėstymo  $L_o$  liposomose taip pat buvo nustatytas žemas BODIPY- $C_{12}$  giminingumas, kas apsunkintų lipidų plaustų klamos matavimus dėl prastos emisijos. Nepaisant plačiai naudojamo BODIPY- $C_{10/12}$  privalumų, jis nėra tinkamas  $L_o$  membranos matavimams ląstelėje, todėl yra ieškoma naujos kartos BODIPY pagrindu paremtų jutiklių, kurie gebėtų nesudėtingai įsiskverbti į fosfolipidinę membraną.

Olšinova *et al.* darbe [46] buvo atlikti tyrimai modifikuotam klamos jutikliui, BODIPY- $C_{12}$  su papildomais  $C_{12}$  anglies grandinėlių inkarais. Tokia molekulinė struktūra yra daug panašesnė į fosfolipidą, nes kiekvienas fosfolipidas turi po dvi uodegas. Eksperimentas patvirtino hipotezę: modifikacija pagerino jutiklio orientavimąsi membranoje, tačiau buvo prarastas gebėjimas atskirti  $L_o$  ir  $L_d$  fazes; todėl šis jutiklis nėra tinkamas lipidų plaustų klamos matavimams.

Polita *et al.* savo darbe [4] pasitelkė kitokią strategiją, kuri rėmėsi fosfolipido molekulinės struktūros mimikavimu. Buvo pritaikytas amfifilinis inkaras su sulfo funkcinė grupe, kuri yra panaši į fosfatinę grupę savo struktūra bei elektriniu potencialu. Kuriant naujos kartos jutiklį taip pat svarbu tinkamoje vietoje pritvirtinti fenil-BODIPY motyvą, kitokiu atveju bus gaunamas žymėtas fosfolipidas, kuris nematuos membranos klamos. Taip pat karkasas su besisukančia dalimi turi steriškai netrukdyti fosfolipidinės membranos savitvarkai.



6 pav. **BODIPY-PM** molekulinė struktūra

Pagal gautus rezultatus, BODIPY-PM (PM – plazminė membrana) klamos jutiklis (žr. 6 pav.) buvo sėkmingai įsiterpęs į liposomos L<sub>0</sub> fazę; turi didelį jautrumą klamos pasikeitimams, tačiau pasireiškia jutiklio biekspontinis fluorescencijos kinetikos gesimas, kas gali reikšti, jog jutiklis matuoja klampą keliose skirtingose membranos vietose. Taip pat nėra aišku, ar išmatuotas klamos pasikeitimas yra dėl pasikeitusios fazės, ar dėl skirtingo jutiklio išsidėstymo fazėse.

## 1.5. Molekulių mechanika

Modeliuojant atomus ar molekules kompiuteriu yra be galo daug būdų, kaip tai galima padaryti. Metodai, kurie puikiai aprašo vienas sistemas, gali būti visiškai netinkami kitoms sistemoms. Taip pat pasirenkant metodą reikia atsižvelgti į turimus kompiuterinius išteklius, kad kompiuteriniai skaičiavimai netruktų ilgiau negu Visatos amžius. Molekulių mechanika (MM) – tai yra supaprastintas molekulių aprašymo būdas, kuriame atomai aprašomi geometriniais taškais, o ryšiai tarp jų – spyruoklėmis [47]. Toks aprašymas yra žymiai paprastesnis negu taikant kvantinę mechaniką (QM), nes nėra suderintinio lauko ir daugialypių integralų skaičiavimų, todėl simuliacijos yra spartesnės. QM yra laikoma aukšto lygio teorija lyginant su MM. Taip pat galima apskaičiuoti molekulių koordinacių laikinę priklausomybę, kuriai taikant MM vadinama molekulių dinamika (MD).

### 1.5.1. Molekulių dinamika

Modeliuojant molekules MD metodu tolydinis laikas yra pakeičiamas diskrečiuoju laiku, kurio žingsnis  $\Delta t$  turi būti mažesnis negu greičiausi procesai sistemoje. Įprastai  $\Delta t$  būna nuo 0,5 fs iki 4 fs [48]. Molekulių poslinkis per  $\Delta t$  yra apskaičiuojamas iš Niutono judėjimo lygčių:

$$\frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i}, \quad (1)$$

čia  $\mathbf{r}_i$  – koordinatė,  $t$  – laikas,  $\mathbf{F}_i$  – jėga,  $m_i$  – masė,  $i$  – atomo indeksas. (1) lygties jėgos  $\mathbf{F}_i$  yra apskaičiuojamos pagal energijos potencialo ( $V$ ) priklausomybę nuo koordinatė:

$$\mathbf{F}_i = - \frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i}. \quad (2)$$

Atliekant MD skaičiavimus svarbu atsižvelgti į aplinkos sąlygas. Įprastai biologinių sistemų eksperimentai yra atliekami kambario temperatūroje ir atmosferos slėgyje. MD vakuume negali užtikrinti įprastinių sąlygų, todėl pastovią molekulių temperatūrą užtikrina termostatai, o pastovų slėgį – bariostatai. Priklausomai nuo naudojamų pastovių sąlygų yra galimi skirtingi termodinaminiai molekulių ansambliai: NVT reiškia, jog yra pastovūs molekulių skaičius, sistemos tūris ir temperatūra, NPT – pastovūs molekulių skaičius, slėgis ir temperatūra. Bariostatų veikimo principas paremtas simuliacijos dėžės keitimu, o termostatų – molekulių kinetinės energijos keitimu; platesni termostatų bei bariostatų veikimo principai aprašyti ankstesniame mokslo tiriamajame darbe [49].

### 1.5.2. Jėgų laukas

Sistemos potencinė energija yra apskaičiuojama iš dviejų dedamųjų: cheminių ryšių ir tarpmolekulinės sąveikos. Kiekviena molekulė turi optimalius ryšio ilgius, kampus bei dvisienius kampus. Todėl pritaikius Huko dėsnį ir parinkus tinkamas jėgos konstantas galima apskaičiuoti visos molekulės potencinę energiją:

$$V = \sum_{a,b} \frac{1}{2} k_{ab} (r_{ab} - r_{ab}^{(0)})^2 + \sum_{c,d,e} \frac{1}{2} k_{cde} (\theta_{cde} - \theta_{cde}^{(0)})^2 + \sum_{i,j,k,l} k_{ijkl} \left( 1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \phi_{ijkl}^{(f)}) \right) + \sum_{u < v} \left[ 4 \epsilon_{uv} \left( \left( \frac{\sigma_{uv}}{r_{uv}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{uv}}{r_{uv}} \right)^6 \right) + \frac{q_u q_v}{4 \pi \epsilon_0 r_{uv}} \right], \quad (3)$$

čia  $k$  – jėgos konstanta;  $r$  – atstumas tarp atomų,  $\theta$  – kampas tarp atomų,  $\varphi$  – dvisienis kampas tarp atomų plokštumų,  $n$  – periodiškumas,  $\varphi^{(f)}$  – fazės poslinkis,  $\varepsilon$  – Lenardo-Džonso potencialo duobės gylis,  $\sigma$  – atstumas, ties kuriuo Lenardo-Džonso potencialas lygus nuliui,  $q$  – atomo krūvis,  $\varepsilon_0$  – dielektrinė konstanta; indeksai  $a, b, c, d, e, i, j, k, l$  žymi ryšiais sujungtais atomus, o indeksai  $u, v$  – visas atomų poras. (0) nurodo, jog tai yra pusiausvirasis dydis. Optimali molekulinė geometrija yra eksperimentiškai nustatoma iš Rentgeno spindulių kristalografijos [50], o jėgų konstantos – iš virpesinių spektrų. Tačiau ne visada reikalingi parametrai yra prieinami dėl išteklių stokos ar dėl eksperimento sudėtingumo, todėl visi trūkstami parametrai yra apskaičiuojami taikant aukštesnio lygio QM teorijas. Cheminių ryšių bei tarpmolekulinės sąveikos parametrų visuma yra vadinama jėgų lauku (*angl.* force field). Ryšiais sujungtų atomų skirtingos kombinacijos turi skirtingus jėgų lauko parametrus. Ryšiai gali skirtis net ir turint tas pačias atomų kombinacijas dėl pasikeitusios hibridizacijos (pvz.,  $sp^2$  ir  $sp^3$  anglis) ir cheminės prigimties, todėl atomai yra papildomai suskirstomi į atomų tipus.

Tarpmolekulinė potencinė energija yra apskaičiuojama ją išskaidant į Kulono bei Van der Valso sąveikas (3). Kiekvienas atomas molekulėje įgauna dalinį elektros krūvį dėl netolygaus elektronų tankio pasiskirstymo aplink kiekvieną atomą. Yra daug metodų, kuriais galima apskaičiuoti taškinį elektros krūvį iš elektrinio potencialo. Suvaržyto elektrostatinio potencialo (*angl.* restrained electrostatic potential – RESP) [51,52] derinimo (*angl.* fitting) metodas yra naudojamas daugelyje baltymų [53,54], organinių junginių [55], lipidų [56] jėgų laukų. Šis metodas apskaičiuoja pasirinktos molekulės (ar kelių molekulės konformacijų) taškinius elektros krūvius, kurie atkurtų QM elektrostatinį lauką. Pritaikyti suvaržymai leidžia priskirti vienodus krūvius chemiškai ekvivalentiems atomams bei geriau subalansuoja apsuptų atomų krūvius. Van der Valso tarpmolekulinė sąveika atsiranda tarp krūvių turinčių ir neturinčių atomų; elektrinis laukas persiskirsto artėjant atomams link vienas kito, todėl dipolis arba susikuria, arba sustiprėja. Dėl šios sąveikos atomai patiria stūmą, kai yra arti vienas kito, o trauką, kai yra nutolę. Ši sąveika apytiksliai yra apskaičiuojama taikant Lenardo-Džonso (LD) potencialą [48].



## 2. Metodika

### 2.1. Ankstesni darbai

Kiekviena modeliuojama sistema yra skirtinga, tačiau egzistuoja tų sistemų panašumai. Todėl yra pravartu taikyti jau naudotas literatūroje modeliavimo procedūras dėl šių priežasčių: galimybė tiesiogiai lyginti rezultatus su kitais darbais ir patikimumas, jei modeliavimo procedūros rezultatas buvo patikrintas eksperimentiškai. BODIPY karkasą turinčių molekulių modeliavimas lipidinėje membranoje yra aprašytas tik keliuose straipsniuose.

Bacalum *et al.* darbe [57] buvo tiriama BODIPY molekulinis dažas turintis sulfo grupę bei kelias anglies grandinėles, todėl jo struktūra yra panaši į BODIPY-PM. Tyrime buvo ieškoma dažo pozicija bei orientavimasis fosfolipidinėje membranoje: taikant BODIPY boro atomo masės tankio profilius ir kampą tarp BODIPY karkaso plokštumos ir Z ašies. Tačiau buvo naudotas pasenęs Berger *et al.* lipidų jėgų laukas [58], kuris netinkamai aprašo gelinę fazę žemoje temperatūroje [59], todėl  $L_0$  gali būti atkurama netinkamai. Dažas aprašytas Gromos 53a6 jėgų lauku [60].

Pederzoli *et al.* atliko panašų tyrimą [61], tačiau tirta BODIPY molekulė neturėjo jokių inkarų. Pozicijos nustatymui buvo pritaikytos pasirinktų BODIPY atomų bei karkaso pasvirimo Z ašies atžvilgiu histogramos ir lipidinės membranos atomų skaičiaus tankio (koncentracijos) profiliai. Fosfolipidinė membrana buvo modeliuojama pritaikius *Slipids* jėgų lauką [62], o BODIPY jėgų laukas nėra įvardintas, tačiau nurodyta parametrizavimui naudota programa *Antechamber* [63], kurioje numatytasis yra *gaff* [64] jėgų laukas, todėl galima daryti prielaidą, jog būtent jį ir naudojo.

Kuimovos mokslinė grupė tyrė BODIPY-C<sub>10</sub> orientavimąsi  $L_d$  fazėje pagal paskutinį simuliacijos kadrą [44]. Toks pozicijos įvertinimas nėra iki galo informatyvus, kadangi net ir esant pusiausvyrai jutiklio pozicija membranoje dėl stochastinių reiškinių turi tam tikrą skirstinį. Taip pat darbe buvo apskaičiuotas jutiklio difuzijos koeficientas fosfolipidinėje membranoje, kuris buvo palygintas su eksperimentu. Straipsnyje nepateikti vidutinio kvadratinio poslinkio (*angl.* mean square displacement – MSD) grafikai, todėl kyla abejonių dėl kai kurių difuzijos koeficientų įverčių nepaisant pakankamai gero atitikimo su eksperimentu. Modeliuojant membraną buvo naudotas *Lipid14* jėgų laukas [65], pasižymintis dideliu našumu, o BODIPY-C<sub>10</sub> buvo naudotas *gaff* jėgų laukas.

BODIPY-PM tyrimo fosfolipidinėje membranoje metodika remiasi visais trimis paminėtais darbais, skirtingi aspektai yra pritaikyti pagal poreikį.

## 2.2. MD programinė ir techninė įranga

Šio darbo tiriamajam objektui pakanka bendros paskirties MD paketo, todėl yra ne viena tinkama programa. Modeliavimui buvo pasirinktas Gromacs 2022.3 (analizei naudota ir 2023.4 versija) paketas [66] dėl šių priežasčių:

1. Gromacs buvo naudota ankstesniuose mokslo tiriamuosiuose darbuose, todėl jau yra susiformavę naudojimosi įgūdžiai.
2. Programa yra pilnai nemokama ir atviro kodo.
3. Intuityvus atomų grupių aprašymas, kuris yra reikalingas temperatūros reguliavimui bei analizei.
4. Turi lipidinei membranai tinkamą bariostatą, ko neturi kitas populiarus Amber (AmberTools) MD paketas [67].
5. Galimybė naudoti suspaustas *.xtc* MD trajektorijas; buvo pastebėta, jog diske jos užima apie tris kartus mažiau vietos negu *.nc* Amber trajektorijos.

MD buvo naudotos kelios techninės įrangos konfigūracijos: tik procesoriai ir procesorius + CUDA grafinė plokštė. Vienos NVIDIA RTX 3070 grafinės plokštės našumas panašus į kelių superkompiuterio mazgų (4 vnt. Intel Xeon Gold 6130 procesoriai: viso 64 branduoliai). Sistemos su grafine plokšte kaina yra eile mažesnė.

## 2.3. Lipidų jėgų laukai

BODIPY-PM klampos jutiklio orientavimosi fosfolipidinėje membranoje tyrimui buvo pasirinkti keli lipidų jėgų laukai:

- *Lipid14*, nes norima tiesiogiai palyginti gautus rezultatus su Kuimovos mokslinės grupės atliktais skaičiavimais [44].
- *Lipid21*, nes tai yra naujesnė *Lipid14* jėgų lauko versija, kurią rekomenduoja Amber MD paketo, kuriame šie laukai yra aprašyti, kūrėjai [67].

## 2.4. Lipidinės membranos validavimas

Pasirinkti lipidų jėgų laukai originaliai yra parašyti Amber, o ne Gromacs paketui, todėl yra reikalingas lipidinės membranos parametrų validavimas, norint įsitikinti, jog Gromacs tinkamai jas modeliuoja. Validavimas taip pat yra svarbus ir dėl to, nes šios dvi programos neturi vienodų MD nustatymų ir kai kurie nustatymai buvo pasirinkti kitokie, nei naudoti jėgų laukų aprašymui:

- Berendseno [68] bariostatas pakeistas į Parinelo-Rahmano [69] bariostatą, kuris tinkamai atkuria stochastinius periodinės dėžės svyravimus [70]. Dėl skirtingų bariostatų taip pat turėjo būti pakeistas slėgio relaksacijos laikas  $\tau_p$ .
- Vandenių ryšių suvaržymo SHAKE algoritmas pakeistas į LINCS algoritmą, kuris yra stabilesnis [48].
- Viena temperatūros reguliavimo grupė yra pakeista į dvi, kas padidina temperatūros reguliavimo stabilumą.

Yra daug įvairių fosfolipidų, iš kurių galima sudaryti  $L_d$  lipidinę membraną jėgų lauko bei programos validavimui, todėl buvo pasirinktas dioleoylfosfocholinas (DOPC), kuris buvo naudotas Kuimovos mokslinės grupės darbe [44]. Sukurti jėgų laukai yra visados palyginami su eksperimentu taikant tam tikras simuliacijos sąlygas. Taigi, validacijai naudotos identiškos sąlygos. *Lipid14* sistema surinkta iš 128 DOPC molekulių (po 64 kiekviename sluoksnyje), 4736 vandens *TIP3* [71] modelio molekulių ir apie 0,15 mol/l kalio chlorido aprašyto *JC* jonų jėgų lauku [72]. *Lipid21* sistema sudaryta iš tiek pat DOPC molekulių ir 5120 *TIP3* H<sub>2</sub>O. *Lipid14* sistema surinkta naudojant CHARMM-GUI [73] internetinę programą, o *Lipid21* sistema gauta iš autorių sukurto internetinio puslapio. Sistemos buvo optimizuotos naudojant minkštuosius branduolius [74] ir įprastinę optimizaciją taikant greičiausio nuolydžio algoritmą. Sistemos buvo pakaitintos nuo 0 K iki 100 K per 5 ps NVT ansamblyje. Pusiausvyros įvedimui sistemos pakaitintos iki 303 K pastovios temperatūros ir 1 bar slėgiui per 100 ps esant NPT ansambliui, taikyta stochastinė dinamika, kurios metu temperatūra reguliuojama naudojant Landževeno termostatą (susidūrimo dažnis  $\gamma = 1 \text{ ps}^{-1}$ ). NPT ir NVT taikyti lipidų sunkiųjų atomų harmoniniai suvaržymai esant 10 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup> jėgos konstantai. Taip pat validacijai buvo varijuoti ir kiti parametrai (žr. 2, 3 priedus). Kiekvienai *Lipid14* parametrų kombinacijai buvo atlikta po penkias MD simuliacijas po 125 ns, o *Lipid21* – po tris MD simuliacijas po 400 ns. Taikytas 2 fs laiko žingsnis, sistemos termodinamiai rodikliai bei atomų koordinatės

nuskaitytos kas 10 ps. Tarpmolekulinės sąveikos aprašymui naudoti Amber paketui kiek įmanoma artimesni nustatymai (žr. 1 priedą).

Po simuliacijos pirmosios 25 ns buvo atmestos *Lipid14* sistemoms, o *Lipid21* – pirmosios 100 ns. Taip yra daroma todėl, kad sistema būtų pasiekusi pusiausvyrą prieš ją analizuojant. Validuojant buvo įvertinami šie pagrindiniai lipidinės membranos parametrai:

- Plotas, tenkantis vienam lipidui ( $A_L$ ):

$$A_L = \frac{2L_x L_y}{n_L}, \quad (4)$$

čia  $L_x, L_y$  – sistemos dėžės kraštinių ilgių,  $n_L$  – lipidų skaičius.

- Tūris, tenkantis vienam lipidui ( $V_L$ ):

$$V_L = \frac{V_D - n_{H_2O} V_{H_2O}}{n_L}, \quad (5)$$

čia  $V_D$  – sistemos dėžės tūris,  $n_{H_2O}$  – vandens molekulių skaičius solvatuojant lipidinę membraną. Vienos vandens molekulės tūris ( $V_{H_2O}$ ) apskaičiuojamas padalinant izotropinės vandens dėžės tūrį iš vandens molekulių skaičiaus (1936 vnt.) jas atskirai simuliuojant 125 ns tomis pačiomis sąlygomis kaip ir lipidinę membraną, pirmąsias 25 ns atmetant pusiausvyros įvedimui.

- Membranos storis ( $D_{HH}$ ) – apskaičiuojamas nustatant atstumą tarp sistemos elektrostatinio potencialo tankio profilio maksimumų. Potencialas buvo glotnintas slenkančiu vidurkiu, kurio lango dydis lygus 3.

Panašus tyrimas jau buvo atliktas ankstesniame mokslo tiriamajame darbe [49], tačiau buvo naudotas daug didesnis vandens molekulių skaičius (nesutampa su jėgų lauko autoriaus nurodytomis sąlygomis), nenaudoti statistiniai testai ir *Lipid21* sistema nebuvo validuota. Norint tiksliau įvertinti, ar Gromacs tinkamai veikia naudojant Amber lipidų jėgų laukus, buvo pasitelktas Fišerio  $F$ -testas dispersijos įvertinimui:

$$F = \frac{s_x^2}{s_y^2}, \quad (6)$$

čia  $F$  – kriterijaus reikšmė,  $s$  – standartinis nuokrypis,  $x$  ir  $y$  – lyginami dydžiai. Taip pat buvo pasitelktas ir Studento  $t$ -testas vidurkio įvertinimui. Šio testo išraiška esant nereikšmingiems dispersijos skirtumams:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s} \sqrt{\frac{n_x n_y}{n_x + n_y}}, \quad (7)$$

$$s = \frac{(n_x - 1)s_x^2 + (n_y - 1)s_y^2}{n_x + n_y - 2}, \quad (8)$$

čia  $n$  – matavimų skaičius, o esant reikšmingiems dispersijos skirtumams:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s_x^2}{n_x} + \frac{s_y^2}{n_y}}}. \quad (9)$$

Tūrio, tenkančio vienam lipidui, skaičiavimų standartiniam nuokrypiui įvertinti naudota:

$$s_{V_L} = \sqrt{\left(\frac{\partial V_L}{\partial V_D}\right)^2 s_{V_D}^2 + \left(\frac{\partial V_L}{\partial V_{H_2O}}\right)^2 s_{V_{H_2O}}^2}. \quad (10)$$

Efektyvusis laisvės laipsnių skaičius ( $f$ ) aproksimuotas pagal Velčo–Saterfveito [75] formulę:

$$f = \frac{\left(\frac{s_x^2}{n_x} + \frac{s_y^2}{n_y}\right)^2}{\frac{s_x^4}{n_x^2(n_x - 1)} + \frac{s_y^4}{n_y^2(n_y - 1)}}, \quad (11)$$

o matavimų skaičius:

$$n = f + 1. \quad (12)$$

Jei apskaičiuota testo kriterijaus reikšmė mažesnė už kritinę kriterijaus reikšmę, tai reiškia, jog su nurodyta klaidos tikimybe (reikšmingumo lygmeniu  $\alpha = 0,05$ ) nėra pagrindo atmesti nulinę hipotezę, kuri suformuluota taip: Gromacs ir Amber vienodai atkuria fosfolipidinės membranos pasirinktą fizikinę savybę.

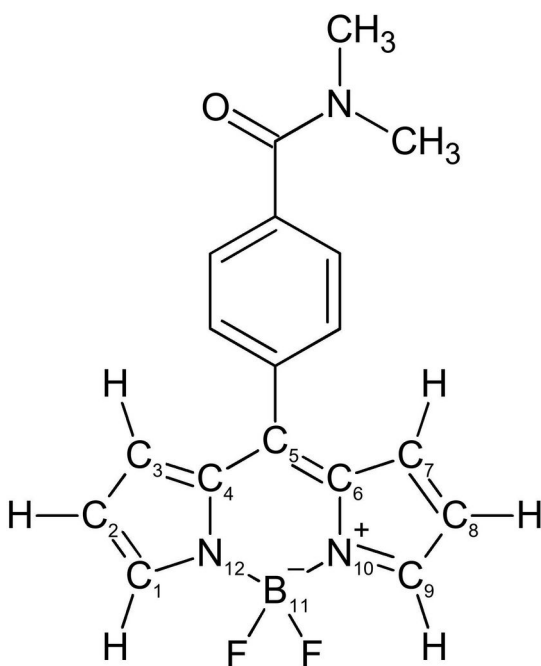
Pagal gautus rezultatus (žr. 2, 3 priedus), naudojant: Parinelo-Rahmano bariostatą ( $\tau_p = 10$  ps), literatūroje naudotą simuliacijos dėžės keitimo būdą ir LINCS ketvirtos eilės suvaržymo algoritmą, gaunami  $D_{HH}$  ir  $A_L$  artimiausi (t. y. statistinis skirtumas mažiausias) lyginant su vertėmis gautomis lipidų jėgų laukų straispniuose. Įdomu tai, jog originaliai naudotas Berendseno bariostatas nepasižymėjo kaip geriausiai atkuriantis membranos parametrus. Taip pat buvo pastebėta, jog nei vienas simuliacijos parametrų bei nustatymų rinkinys nesugebėjo atkurti  $V_L$ , t. y. visur gaunami rezultatai, kurie statistiškai skiriasi. Tai parodo, jog tarp Gromacs ir Amber MD algoritmų egzistuoja skirtumai, kurie nulemia nedidelius kai kurių membranos parametrų įverčių pokyčius. Nepaisant statistiškai reikšmingų  $V_L$  skirtumų, procentiškai jie yra nedideli, todėl Gromacs galima naudoti su Amber lipidų jėgų laukais.

Šio tyrimo metu buvo pastebėta, jog naudojant anizotropinį dėžės dydžio keitimo būdą su Parinelo-Rahmano bariostatu gali stipriai pakeisti sistemos dėžės matmenys. Įprastai tai nesukelia problemų, jei pasikeitimai nėra dideli, tačiau kartais kai kurios MD trajektorijos pasiekdavo tokius mažus dėžės matmenis, jog gali pasireikšti nefizikinės sąveikos. Tokių pasikeitimų priežastis yra Parinelo-Rahmano bariostato stochastinės savybės. Norint to išvengti, rekomenduojama naudoti pusiauizotropinį dėžės dydžio keitimo būdą. Tyrimo metu netinkamos MD trajektorijos buvo paleistos iš naujo.

## 2.5. BODIPY jėgų laukai

### 2.5.1. *gaff* ir *gaff2* jėgų laukai

Kuimovos mokslinės grupės darbe naudotas *gaff* jėgų laukas [64] BODIPY molekulės aprašymui [44], tačiau jau yra sukurta naujesnė jėgų lauko versija – *gaff2* [55]. Norint išsiaiškinti, kuris jėgų laukas tinkamiau aprašo BODIPY-PM molekulę, buvo nuspręsta palyginti supaprastintos BODIPY molekulės (žr. 7 pav.) optimalią geometriją apskaičiuotą MM ir QM metodais.



7 pav. BODIPY-NMe2 molekulinė struktūra

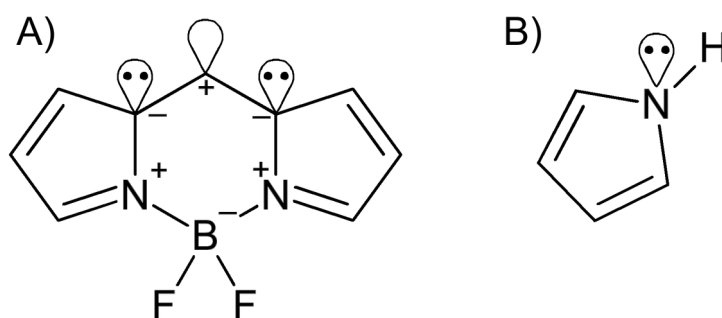
Molekulės krūvių apskaičiavimui pirmiausiai buvo rasti visi konformeriai (iš viso 2), kurių geometrijos optimizuotos vakuume taikant HF/6-31G\* lygio kvantinę teoriją. RESP

krūviai konformerams buvo apskaičiuoti taikant R.E.D. internetinį serverį [76]. Visiems QM skaičiavimams naudota Gaussian 16 rev. C.01 programa [77]. Molekulės atomų tipai buvo priskirti naudojant Antechamber [63], tačiau programa nurodė, jog galimai kai kurie atomų tipai yra priskirti netinkamai, todėl turėjo būti atliktas parinktų atomų tipų tinkamumo tyrimas.

## 2.5.2. Atomų tipų parinkimas

Pirmiausiai buvo klausimas dėl  $C_5$  atomo tipo (žr. 7 pav.), kadangi nėra aišku ar centrinis žiedas su boro atomu yra aromatinis. Hiukelio aromatiškumo taisyklė teigia, kad žiede bus aromatinė sistema tada, jei žiedas bus sudarytas iš  $4n + 2 \pi$  elektronų išsidėsčiusių aplink kiekvieną žiedo atomą; pagal šią taisyklę BODIPY karkaso centrinis žiedas nėra aromatinis. Kadangi Hiukelio taisyklė yra supaprastinimas, todėl buvo pasitelkti papildomi įrankiai aromatiškumo patikrinimui taikant Kores *et al.* [78] metodiką su Multiwfn 3.8 programa [79]. Priede 3 yra pateikti įvairūs aromatiškumo įvertinimo indeksai bei kriterijai, pagal kuriuos BODIPY centrinis žiedas su boro atomu nėra aromatinis, ką ir teigia Hiukelio taisyklė. Kadangi  $C_5$  nepriklauso aromatinei sistemai, jis gali turėti tik kelis atomų tipus (žr. priedą 5).

Toliau klausimas kyla dėl BODIPY karkaso žiede esančių atomų tipų ir jų išsidėstymo. Iš pirmo žvilgsnio gali atrodyti, jog atomų tipai turėtų sutapti su pirolu molekulės atomų tipais, tačiau atlikus natūraliųjų ryšių orbitalių (*angl.* natural bond orbital – NBO) analizę su Gaussian 16 buvo pastebėta, jog BODIPY molekulėje dvigubų ryšių išsidėstymas šoniniuose žieduose yra pasisukęs  $120^\circ$  lyginant su pirolu (žr. 8 pav.). Todėl patikrinti keli įmanomi atomų tipų išsidėstymai BODIPY šoniniuose žieduose (žr. priedą 5).



8 pav. Molekulių dvigubų ryšių bei laisvų elektronų porų išsidėstymas pagal NBO analizę (A – BODIPY, B – pirolu molekulėse)

### 2.5.3. Geometrijos lyginimas

Simuliuojant molekules, jų geometrijos yra užrašomos arba Dekarto koordinatėse, arba vidinėse koordinatėse. Kelių molekulių Dekarto koordinatė lyginimas yra beprasmiškas, kadangi egzistuoja 6 laisvės laipsniai (3 poslinkio, 3 sukimo). Vidinės koordinatės taip pat netinka kelių molekulių geometrijų lyginimui, kadangi ryšių ilgių, kampų ir dvisienių kampų pasikeitimai priklauso nuo to, kaip yra užrašomos vidinės koordinatės. Todėl yra reikalingas nedviprasmiškas molekulių geometrijos lyginimo būdas. Buvo nuspręsta lyginti visus chemiškai sujungtų ryšių: ilgius, kampus ir dvisienių kampus. Gaunamų dydžių yra daug daugiau negu Dekarto ar vidinėse koordinatėse, tačiau gaunamas užrašymas yra vienareikšmiškas žiūrint iš cheminės pusės. Lyginant molekules yra apskaičiuojamas absoliutus ir kvadratinis pasirinkto dydžio nuokrypis. Atitinkamo parametro (ilgio, kampo ar dvisienio kampo) nuokrypiai yra susumuojami, taip gaunamas bendras skirtumo įvertinimas tarp kelių molekulių. Apskaičiuojant dvisienio kampo nuokrypį taikyta periodiškumo sąlyga turint omeny jog  $180^\circ$  ir  $-180^\circ$  dvisienis kampas atitinka tą pačią geometriją.

Molekulės geometrinės struktūros atskaitos taškas buvo pasirinktas BODIPY-NMe<sub>2</sub> mažiausios energijos konformero optimali geometrija apskaičiuota vakuume taikant MP2/6-31\* teoriją ir funkcijų bazę. Iš Antechamber gauti atomų tipai buvo pakeisti pagal poreikį ir trūkstanti jėgų lauko parametrai buvo sugeneruoti naudojant parmchk2 paprogramę *gaff* ir *gaff2* jėgų laukams. Kadangi šie jėgų laukai savyje neturi boro atomų parametru, tai parmchk2 pagal vidinius algoritmus nustato borui artimiausią atomų tipą, kuris atitinka sp<sup>2</sup> anglį. Buvo pakeisti boro Lenardo-Džonso parametrai į apskaičiuotus literatūroje [80].

Keičiant jėgų laukus ir atomų tipus gautos skirtingos sistemos, kurios buvo optimizuotos. Optimalios MM geometrijos palygintos su QM pagrindinės būsenos geometrija. Iš gautų rezultatų (žr. priedą 5) pirmiausiai yra matyti, jog *gaff2* jėgų laukas nepatenkinamai aprašo BODIPY-NMe<sub>2</sub> molekulę, nes karkaso ir fenilo žiedo ašys nebe sutampa, arba karkasas yra persikreipęs. Nepaisant to, jog *gaff2* jėgų laukas yra naujesnis, *gaff* jėgų laukas daug geriau aprašo BODIPY-NMe<sub>2</sub> molekulę. Nepriklausomai nuo atomų tipų kombinacijos, karkasas išlieka apytiksliai vienoje plokštumoje, išlaikomas tinkamas fenilo žiedo orientavimasis karkaso atžvilgiu. Mažiausius nuokrypius turi atomų tipai parinkti pagal NBO analizę, o ne pirolą. Šio atomų tipų rinkinys naudotas tolimesniame jutiklio orientavimosi fosfolipidinėje membranoje tyrime.



Geometrijos nuokrypis, lyginant tarp MM ir QM geometrijų, yra pakankamai didelis net ir geriausia atomų tipų rinkiniui. Šią problemą galima išspręsti tik iš naujo parametrizuojant *gaff* jėgų lauko pasirinktus parametrus, kas aktualu borui ir C<sub>5</sub>. Šio darbo metu buvo bandoma iš naujo parametrizuoti pasirinktus parametrus taikant paramfit paprogramę iš Antechamber, tačiau nesėkmingai. To priežastis yra BODIPY daugiacykliškumas, kuris neleidžia izoliuoti norimo parametro apskaičiuojant PES. Keičiant kurį nors dydį (kampą, ilgį ar dvisienį kampą) keičiasi daugelis kitų parametrų dėl suvaržytos sistemos, todėl tai nėra trivialus uždavinys. Nepaisant to, jog geometrija yra netobula, ji yra patenkinama, nes tiriant jutiklio orientavimąsi lipidinėje membranoje yra svarbesnės tarpmolekulinės sąveikos.

## 2.6. Sistemų paruošimas

Tyrimui buvo nuspręsta modeliuoti tris sistemas:

- L<sub>d</sub> fazę taikant *Lipid14*, sudarytą iš 128 vnt. DOPC, 4736 vnt. H<sub>2</sub>O.
- L<sub>d</sub> fazę taikant *Lipid21*, sudarytą iš 128 vnt. DOPC, 5120 vnt. H<sub>2</sub>O.
- L<sub>o</sub> fazę taikant *Lipid21*, sudarytą iš 60 vnt. DOPC, 60 vnt. DPPC, 12 vnt. cholesterolio ir 5280 vnt. H<sub>2</sub>O.

Kiekviena sistema papildomai turi po vieną BODIPY-PM jutiklio molekulę ir apie 0,15 mol/l kalio chlorido druskos vandeninėje terpėje.

Iš L<sub>d</sub> *Lipid14* sistemos gaunamas difuzijos koeficientas leidžia jį lyginti su rezultatais, aprašytais Kuimovos mokslinės grupės straipsnyje [44]. Visos sistemos leidžia palyginti difuzijos koeficientą ir jutiklio orientavimąsi tarpusavyje.

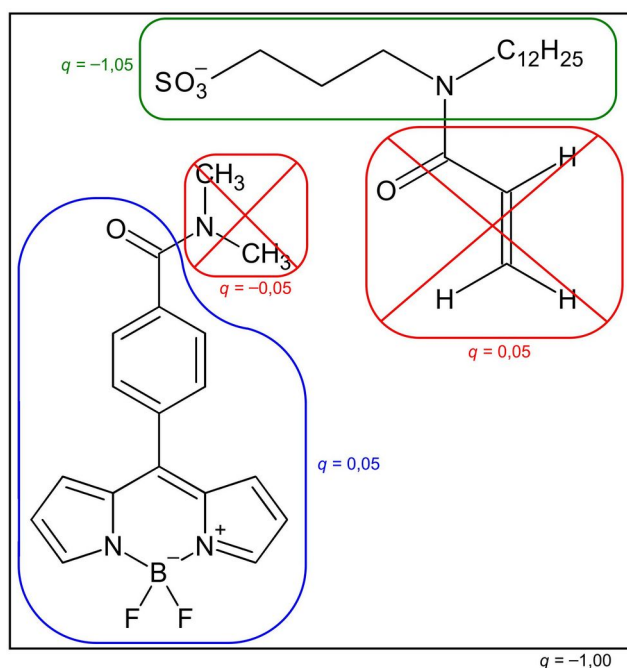
### 2.6.1. Jutiklio jėgų laukas: *Lipid14* sistema

BODIPY-PM ryšių parametrai aprašyti naudojant *gaff* jėgų lauką ir atomų tipus, nustatytus 2.5 skyriuje. Sugeneruotame jėgų lauke boro atomo Lenardo-Džonso parametrai nebuvo pakeisti. Krūvių radimui pasirinktas vienas BODIPY-PM konformas taip kaip [44] straipsnyje, tačiau su pridėtu kalio atomu prie sulfo grupės. Kalio atomas reikalingas tam, kad optimizuojant geometriją inkaras su sulfo grupe nesusisuktų ir išlaikytų pradinę konformaciją. Po optimizacijos kalio atomas pašalintas. Optimizacijai ir krūvių radimui naudota Gaussian 16 su HF/6-31G\* QM teorija. Daliniai RESP krūviai rasti naudojant Antechamber programą.

## 2.6.2. Jutiklio jėgų laukas: *Lipid21* sistemos

BODIPY-PM ryšių parametrai aprašyti naudojant *gaff* jėgų lauką ir atomų tipus nustatytus 2.5 skyriuje. Sugeneruotame jėgų lauke boro atomo Lenardo-Džonso parametrai buvo pakeisti į randamus literatūroje [80] tam, kad būtų geriau atkuriamos tarpmolekulinė sąveika. Tikslūs daliniai krūviai yra labai svarbūs aprašant tarpmolekulinę sąveiką, todėl yra reikalinga RESP krūvių radimo procedūra didesniam konformerų kiekiui.

Parametrizuojant *Lipid14* jėgų lauką buvo pasirinktas tam tikras kiekis fosfolipido grandinėlių, kurioms buvo rasti bendri daliniai krūviai neatlikus optimizacijos. BODIPY-PM inkaro krūvių radimui buvo pasirinkti 50 atsitiktinių grandinėlių konformerų iš *Lipid21* autorių pasidalinto dilaurofosfocholino (DLPC) MD simuliacijos. Grandinėlių molekulinė struktūra buvo modifikuota taip, kad atitiktų BODIPY-PM inkarą, ir kalio jonai buvo pridėti prie sulfo grupės. Kadangi dalis anglies grandinėlių konformerų yra susisukusios taip, jog gali vykti papildoma sąveika su BODIPY molekule, todėl ji buvo pakeista pakaitine mažesne grupe (*angl.* capping) pagal *Lipid11* [81] naudotą procedūrą (žr. 9 pav.).



9 pav. Pakaitinių funkcinių grupių naudojimo schema apskaičiuojant skirtingų BODIPY-PM molekulės fragmentų RESP dalinius krūvius

Suvaržant dvisienius kampus buvo atlikta dalies inkaro su sulfo grupe optimizacija, o alifatinė dalis buvo pilnai suvaržyta. Toks sprendimas buvo priimtas todėl, kad keičiant molekulinę struktūrą iš DLPC į BODIPY-PM inkaro yra susiduriama su specifiniais ryšių bei kampų pasikeitimais. Optimizacija pirmiausiai buvo atlikta taikant pusempirinį metodą PM6 ir vėliau ir HF/6-31G\*. Po optimizacijos kalio atomas pašalintas. Bendri daliniai RESP krūviai visiems grandinėlių konformerams rasti naudojant R.E.D. programą, suvaržant mažesnės grupės krūvį bei jį pašalinant (žr. 9 pav.). Panaši procedūra naudota ir BODIPY fragmentui; iš viso naudoti du konformeri RESP krūvių radimui, kurio metu mažesnioji grupė buvo pašalinta. Norint padidinti gaunamų krūvių tikslumą, krūvių suvaržymas mažesnei grupei nebuvo lygus nuliui. Optimizacijai ir krūvių radimui naudota Gaussian 16 su HF/6-31G\* QM teorija.

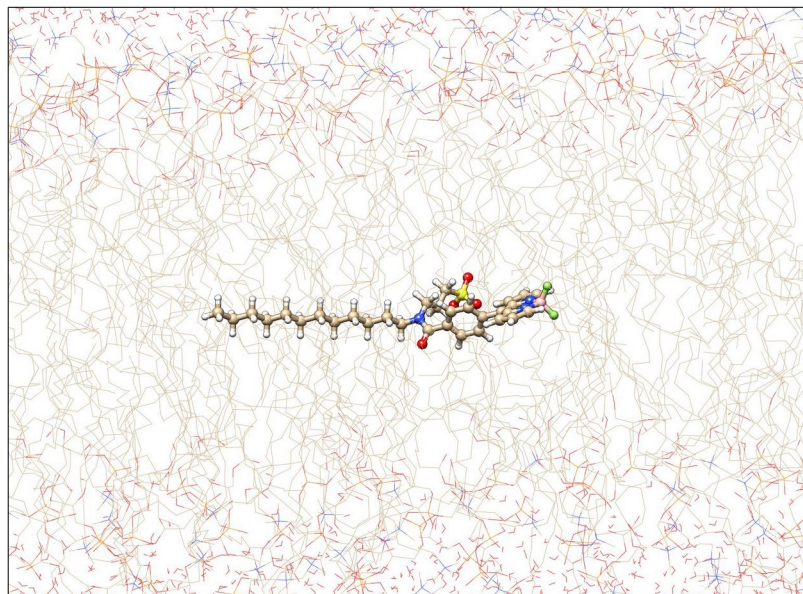
### 2.6.3. Sistemos surinkimas

Lipidinės sistemos buvo surinktos naudojant CHARMM-GUI aplikaciją, išskyrus *L<sub>d</sub> Lipid21* sistemą, kurios pradinė struktūra buvo paimta iš šio jėgų lauko autorių internetinio puslapio. Trūkstanti kalio chlorido jonų kiekiai buvo pridėti rankiniu būdu, o BODIPY-PM jutiklis buvo orientuotas lipidinėje membranoje naudojant Chimera programą [82]. Primityvus jutiklio inkorporavimas lipidinėje membranoje sukuria ryšių bei atomų persidengimus, kurie yra panaikinami geometrijos optimizacijos metu taikant minkštuosius branduolius. Iš viso buvo surinktos 5 skirtingos pradinės sąlygos kiekvienai sistemai, kuriose BODIPY-PM jutiklis orientuotas taip:

- a** Statmenai Z ašiai membranos centre (žr. 10 pav.).
- b** Lygiagrečiai Z ašiai membranos centre.
- c** Lygiagrečiai Z ašiai membranos paviršiuje, tačiau uodega patalpinta vandenyje.
- d** Lygiagrečiai Z ašiai membranos paviršiuje, tačiau BODIPY karkasas patalpintas vandenyje.
- e** Visa BODIPY-PM molekulė patalpinta vandenyje.

Toks pasirinkimas leidžia įvertinti, ar jutiklis orientuojasi membranoje nepriklausomai nuo pradinių sąlygų, ir ar egzistuoja lokali termodinaminė metastabilios būsenos. Tiesa, norint nuodugniau ištirti tokių būsenų egzistavimą reiktų surinkti daugiau sistemų su skirtingomis pradinėmis sąlygomis.

Surinkus sistemą buvo sukurti Amber paketo koordinačių bei topologijos failai, kurie buvo konvertuoti į Gromacs atitinkamus failus naudojant *parmed* Python 3 biblioteką iš AmberTools paketo.



10 pav. Įterpto jutiklio į membraną pradinės sąlygos  
(a) pavyzdys

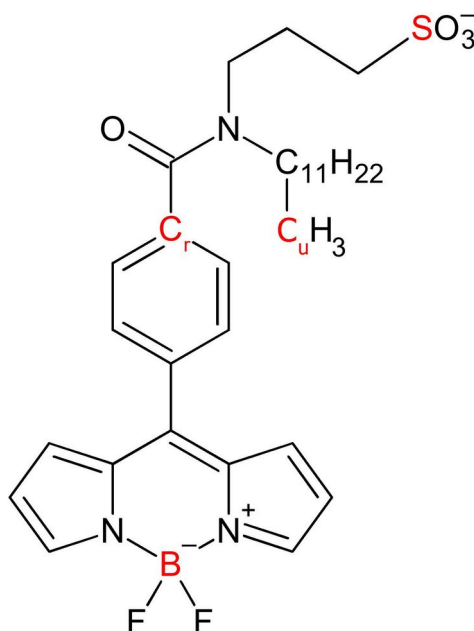
## 2.7. MD ir analizė

Paruošus sistemas, pirmiausiai buvo atlikta sistemos optimizacija taikant minkštuosius branduolius, o vėliau ir įprastinė optimizacija; sudaryti NVT ir NPT ansambliai. Atliekant MD buvo taikomos identiškios sąlygos bei optimalūs parametrai rasti lipidinės membranos validavimo metu, išskyrus temperatūrą bei simuliacijos laiką. Jutiklio orientavimosi tyrime kiekviena simuliacija buvo paleista po 150 ns;  $L_d$  fazės temperatūra 303 K, o  $L_o$  fazės – 293 K. Jutiklio difuzijos koeficiento skaičiavimams simuliacijos laikas buvo pratęstas papildomomis 300 ns (iš viso 450 ns) toms sistemoms, kurios turėjo **a** pradinę sąlygą; nepriklausomai nuo membranos fazės, buvo nustatyta 293 K temperatūra.

### 2.7.1. Jutiklio orientavimasis

Kiekvienos sistemos simuliacijos analizei pirmosios 50 ns buvo atmestos, tuo metu jutiklis pasiekė tam tikrą pusiausvyrinę būseną. Jutiklio orientavimuisi nustatyti buvo apskaičiuotos jutiklio sieros (žym. S), boro (žym. B), fenilo anglies (šalia amidinės grupės)

(žym. C<sub>r</sub>) ir alifatinės grandinės paskutinio anglies (žym. C<sub>u</sub>) (žr. 11 pav.) atomų atstumai nuo lipidinės membranos masės centro.



11 pav. **Orientavimosi analizei naudotų atomų vietas BODIPY-PM molekulėje** (pažymėti raudonai)

Atstumų kitimas nuo laiko pateiktas grafike (žr. priedus 6 – 8), o atstumų skirstinys analizuojamame laiko ruože – histogramoje (žr. priedus 9 – 11). Buvo apskaičiuotos histogramų medianos bei interkvartiliniai intervalai (*angl.* interquartile range – IQR), kurie parodo atstumą tarp pirmo ir trečio kvartilų; tai yra vienas iš dispersijos įvertinimo būdų. Neparametrinė statistika buvo pasirinkta dėl dviejų priežasčių: kai kurie atstumų skirstiniai akivaizdžiai nėra normalieji ir apskaičiuoti ilgai yra autokoreliuoti, kas neleidžia taikyti parametrinės statistikos, kadangi negalioja centrinė ribinė teorema ir standartinio nuokrypio įprastinis apskaičiavimas nėra galimas.

Nustatant jutiklio poziciją lipido membranos atžvilgiu buvo apskaičiuoti ir membranos lipidų kai kurių atomų skaičiaus tankiai (koncentracijos): karbonilų (žym. COO), fosfatų (žym. PO<sub>4</sub>), paskutinio uodegų anglies ir jo vandenilių (žym. CH<sub>3</sub>) ir L<sub>o</sub> fazei visų cholesterolio (žym. chol) atomų.

## 2.7.2. Difuzijos koeficientas

Difuzijos koeficiento skaičiavimams buvo naudotos paskutinės 200 ns simuliacijos (pirmosios 250 ns atmestos) ir sistemos masės centras pakeistas į membranos sluoksnio, kuriame jutiklis įsitvirtinęs. Jutiklio koordinatinių vidutinis kvadratinis poslinkis buvo apskaičiuotas kas 10 ps taikant 20 ns langą. Tiesiniam regionui pritaikyta regresija ir rastas  $k$  tiesės krypties koeficientas, pagal kurį, taikant Einšteino sąryšį (12), buvo rastas jutiklio difuzijos koeficientas ( $D$ ) XY plokštumai:

$$D = \frac{\lim_{t \rightarrow \infty} \langle \|\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0)\|^2 \rangle}{2nt} = \frac{k}{2n}, \quad (13)$$

čia  $\mathbf{r}$  – koordinatės vektorius,  $i$  – pasirinkto atomo indeksas,  $n$  – dimensijų skaičius,  $t$  – laiko žingsnis. Paklaida randama padalinant MSD tiesės duomenis pusiau ir apskaičiuojant skirtingų MSD regionų difuzijos koeficientų skirtumą.

### 3. Rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1.1. Jutiklio orientavimasis

Beveik visoms pradinėms sąlygoms ir fazėms po 50 ns simuliacijos BODIPY karkasas buvo stabiliai įsitvirtinęs membranos paviršiuje: uodega įsiskverbusi tarp fosfolipidų uodegų, o sulfo grupė – lipidinės membranos paviršiuje. Toks išsidėstymas patvirtina, kad sulfo grupė, dėl savo panašumo į fosfatinę grupę, kartu su alifatine grandinėle yra tinkama imituojant fosfolipidą, ir kad papildomas balastas (BODIPY karkasas) netrukdo įsitvirtinimui į membraną. Toks stabilizavimasis nėra būdingas  $L_o$  sistemai (pradinės sąlygos – jutiklis pilnai yra vandenyje) net ir po 150 ns; jutiklis dėl tankesnės  $L_o$  fazės nesugebėjo savaime prasiskverbti į lipidinę membraną. Į  $L_d$  fazę, nepriklausomai nuo jėgų lauko, iš vandens fazės jutiklis įsitvirtino tik per 30 ns. Tai parodo, kad jutiklio įsitvirtinimo membranoje proceso aktyvacijos energija yra daug didesnė  $L_o$  fazei negu  $L_d$ , tačiau įsitvirtinusi sistema yra termodinamiškai stabili.

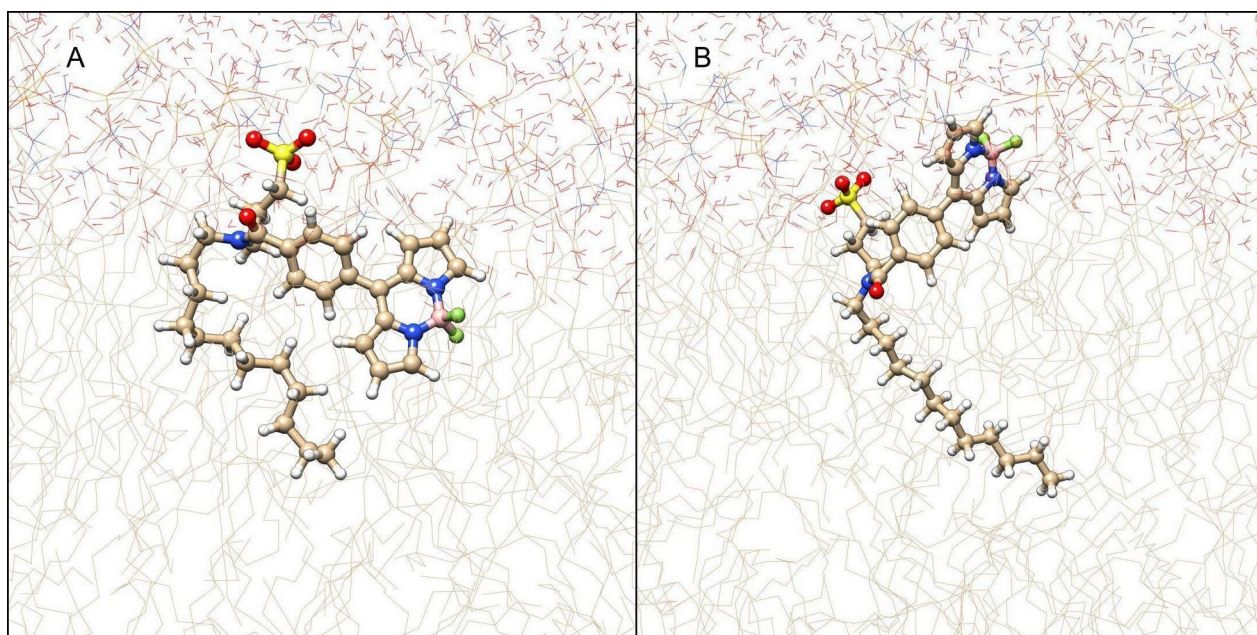
1 Lentelė. **Atomų pozicijų bei membranos atomų grupių atstumai nuo membranos centro** (sudaryta pagal atomų atstumo histogramas ir atomų skaičiaus tankio profilius (žr. priedus 9, 10, 11))

Fazė ir jėgų laukas	Pradinės sąlygos	Atomo pozicijos mediana $\pm$ IQR, Å				Membranos grupės koncentracijos maksimumo pozicija, Å			
		$C_u$	B	$C_r$	S	$CH_3$	Chol	COO	$PO_4$
$L_d$ Lipid14	<b>a</b>	2,5 $\pm$ 3,7	12,1 $\pm$ 3,5	12,9 $\pm$ 2,4	16,9 $\pm$ 2,4	0,4	–	14,1	18,7
	<b>b</b>	2,2 $\pm$ 4,1	10,8 $\pm$ 3,9	12,2 $\pm$ 3,7	16,1 $\pm$ 3,3	0,4		14,4	18,8
	<b>c</b>	2,5 $\pm$ 4,8	12,6 $\pm$ 4,3	12,5 $\pm$ 2,6	16,3 $\pm$ 2,6	0,7		14,3	18,7
	<b>d</b>	2,4 $\pm$ 3,3	13,2 $\pm$ 3,3	13,3 $\pm$ 2,2	17,5 $\pm$ 2,5	0,7		14,3	18,7
	<b>e</b>	2,1 $\pm$ 3,3	11,8 $\pm$ 3,9	12,4 $\pm$ 2,7	16,6 $\pm$ 2,9	0,4		14,4	18,7
$L_d$ Lipid21	<b>a</b>	2,4 $\pm$ 3,4	11,5 $\pm$ 2,4	13,1 $\pm$ 2,0	17,7 $\pm$ 2,2	0,4	–	15,3	19,7
	<b>b</b>	4,1 $\pm$ 4,2	13,8 $\pm$ 3,8	14,2 $\pm$ 2,4	17,8 $\pm$ 2,2	0,4		15,0	19,4
	<b>c</b>	4,0 $\pm$ 3,7	11,4 $\pm$ 3,4	12,4 $\pm$ 2,3	17,4 $\pm$ 2,4	0,4		15,2	19,6
	<b>d</b>	1,4 $\pm$ 3,6	12,3 $\pm$ 3,7	11,6 $\pm$ 2,7	16,4 $\pm$ 3,1	0,7		14,8	19,5
	<b>e</b>	2,8 $\pm$ 4,0	11,1 $\pm$ 2,9	12,9 $\pm$ 2,3	17,4 $\pm$ 2,4	0,4		15,0	19,8
$L_o$ Lipid21	<b>a</b>	3,7 $\pm$ 5,4	10,9 $\pm$ 3,5	12,2 $\pm$ 2,3	17,5 $\pm$ 2,3	1,2	10,2	16,6	21,3
	<b>b</b>	3,7 $\pm$ 3,5	10,4 $\pm$ 2,5	12,1 $\pm$ 2,2	16,3 $\pm$ 2,0	1,2	9,7	16,8	20,8
	<b>c</b>	3,0 $\pm$ 3,2	10,4 $\pm$ 3,0	14,1 $\pm$ 2,1	19,1 $\pm$ 2,3	1,2	8,9	16,5	21,2
	<b>d</b>	4,0 $\pm$ 2,5	10,9 $\pm$ 1,9	16,1 $\pm$ 1,5	21,3 $\pm$ 2,0	1,2	9,5	17,4	21,5

Nagrinėjant jutiklio atomų atstumo, nuo lipidinės membranos masės centro, priklausomybę nuo laiko (žr. priedus 6, 7, 8) galima pastebėti, jog atomų išsidėstymas išlieka pastovus su tam tikru triukšmu. Grafikuose P6.1, P6.2, P7.1, P7.5, P8.1, P8.3 yra

matomi kelių nanosekundžių  $C_u$  atomo nestabilumai, kada jo atstumas iki membranos centro tampa vienodas ar net dar didesnis negu B atomo; šie intarpai atitinka susisukusio BODIPY-PM konformacijas.

Esminis skirtumas tarp laikinių priklausomybių yra matomas P8.3 ir P8.4 lyginant su kitomis: B ir  $C_r$  atomai stabiliai išsidėsto didesniu atstumu vienas nuo kito Z ašies atžvilgiu (neskaitant triukšmo), o tai reiškia, kad BODIPY karkasas yra stabiliai pasviręs link membranos centro. Kitose sistemose ( $L_d$  ir  $L_o$ ) BODIPY ašis gali būti pasvirusi į abi puses (žr. 12 pav.). Kampas skaičiuojamas tarp BODIPY ašies ir membranos plokštumos. Po 130 ns *a Lipid21* simuliacijos BODIPY karkaso ašis buvo pasvirusi  $26,8^\circ$  link membranos centro, o po 150 ns –  $47,3^\circ$  link vandeninės terpės. Būsena, kurios metu BODIPY karkasas nukreiptas į vandeninę terpę egzistuoja nuo kelių iki kelių dešimčių nanosekundžių. Pagal 12 pav., BODIPY karkasas A ir B skirtingai sąveikauja su lipidine membrana ir vandenine terpe, todėl gali pasikeisti PES keičiantis jutiklio terpei [83].

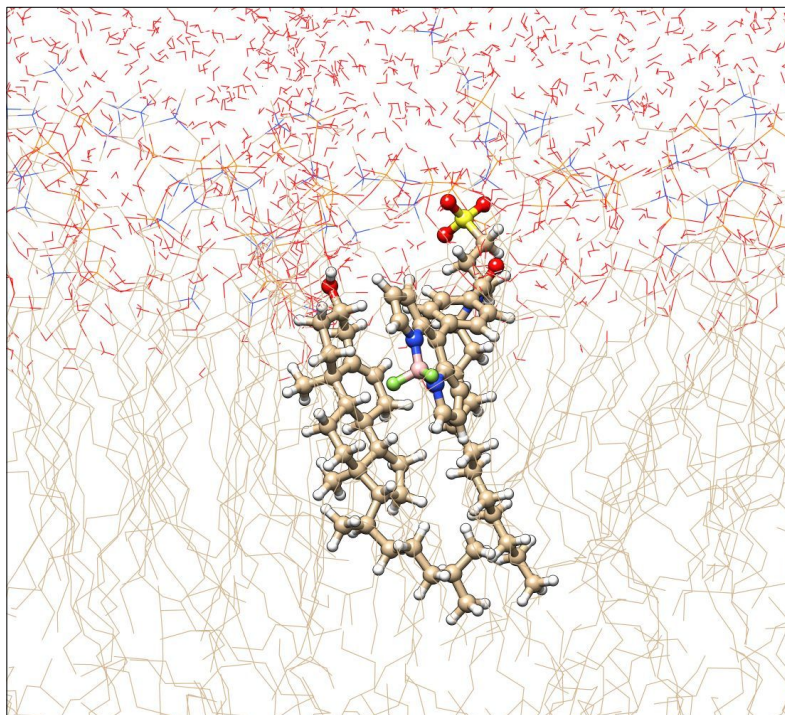


12 pav. Jutiklio pasvirusios būsenos geometrijos (A – karkasas pasviręs link membranos centro, B – karkasas pasviręs link vandeninės terpės)

Būsenos, kurioje BODIPY stabiliai pasviręs, egzistavimas  $L_o$  fazėje siejasi su cholesterolium: yra matoma tam tikra koreliacija tarp cholesterolio maksimumo (1 lentelė) ir  $C_r$  pozicijos. Atidžiau panagrinėjus simuliacijos kadrus buvo pastebėta, jog visą simuliacijos laiką po pusiausvyros įvedimo (50 ns) prie BODIPY-PM inkaro *d* sistemoje, o *c* sistemoje ir prie pačio BODIPY karkaso buvo prisijungęs cholesterolis (žr. 13 pav.).



Atliekant MD difuzijos koeficiento skaičiavimus, simuliacijos pabaigoje cholesterolis galiausiai atsiskyrė nuo BODIPY, todėl ši būseną tikriausiai nėra stabili ilgesnių laikų masteliu.



13 pav. L<sub>0</sub> fazės lipidinės membranos MD paskutinis kadras, c pradinės salygos

Nagrinėjant membranos grupių išsidėstymą (1 lentelė) yra matoma tendencija, kad COO ir PO<sub>4</sub> grupės yra toliau nuo masės centro esant *Lipid21* jėgų laukui negu *Lipid14* esant L<sub>d</sub> fazei. Toks rezultatas ir turėtų būti, nes *Lipid14* ir *Lipid21* autorių atliktuose skaičiavimuose *Lipid21* membrana yra storesnė. Taip pat, L<sub>0</sub> fazės grupės yra toliau išsidėsčiusios negu L<sub>d</sub> fazės, nes L<sub>d</sub> membrana yra storesnė dėl tankesnio horizontalaus susispaudimo. Lyginant membranos grupių išsidėstymą esant skirtingoms pradinėms sąlygoms nėra matomi dideli skirtumai, išskyrus cholesterolio molekulę.

Žvelgiant į 1 lentelę, B yra aptinkamas statistiškai dažniau arčiau lipidinės membranos centro negu C<sub>r</sub>. Su *Lipid14* jėgų lauku yra matomas didesnis stabilumas C<sub>u</sub> atomui tarp skirtingų sistemų lyginant su *Lipid21* jėgų lauku. Visoms sistemoms dispersija C<sub>u</sub> atomui yra didžiausia, kas yra logiška, nes membranos CH<sub>3</sub> koncentracijos pasiskirstymas yra labai platus (platesnis tik cholesterolio). B atomo dispersija yra mažesnė negu C<sub>u</sub>, tačiau didesnė už C<sub>r</sub> iki 50 %. To priežastis yra BODIPY suvaržymas

ties fenilo žiedu, tokiu būdu BODIPY karkasas turi daugiau laisvės judėti, nes jį mažiau varžo inkaras.

S dispersija yra mažiausia dėl stiprios Kulono sąveikos su membranos fosfolipidų galvomis. Visais atvejais sieros atomas yra arčiau membranos masės centro negu fosfatinė grupė, nes fosfato ir sulfo grupės yra neigiamo krūvio, todėl jos stumia viena kitą. Tačiau giliau membranoje yra cholino teigiama grupė, kuri ir traukia sulfo grupę. S ir C<sub>r</sub> skirtumai L<sub>d</sub> fazėje tarp skirtingų jėgų laukų yra neesminiai, nes jie egzistuoja dėl pasikeitusio membranos storio. Esant L<sub>o</sub> fazei S yra toliausiai lyginant su kitomis sistemomis, tačiau Boro atomas yra arčiausiai membranos masės centro. Taip gali būti tik tada, jei jutiklis yra suspaudžiamas XY plokštumoje ir tada jis ištįsta Z ašimi. Tai ir vyksta su lipidais pereinant iš L<sub>d</sub> į L<sub>o</sub> fazę, kada sumažėja plotas tenkantis vienam lipidui dėl tankesnio lipidų išsidėstymo.

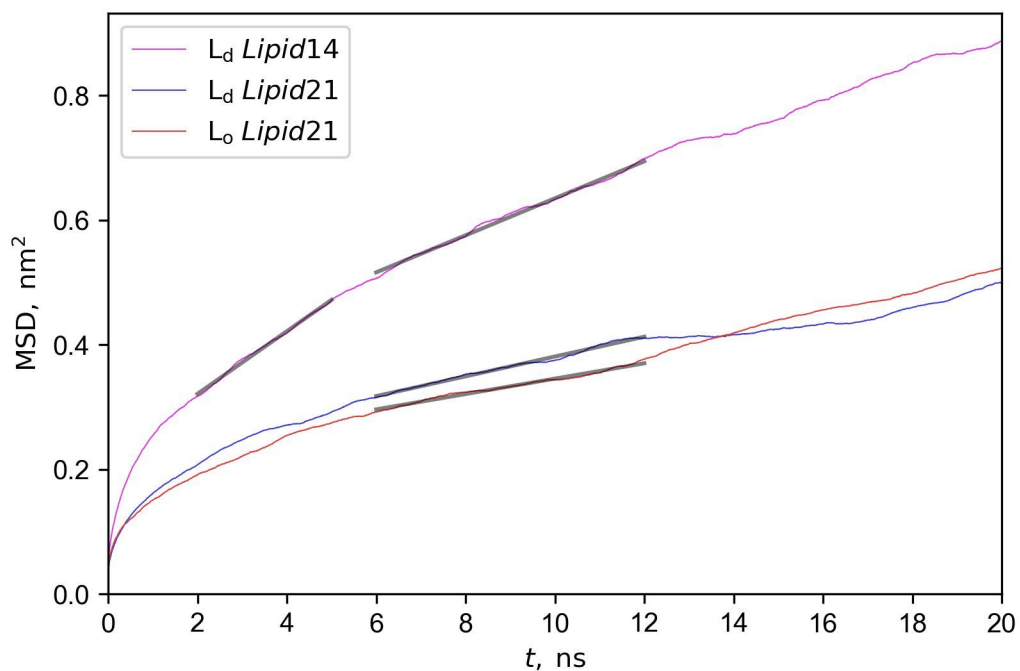
### 3.1.2. Difuzijos koeficientas

Difuzijos koeficientas Kuimova darbo grupės straipsnyje [44] buvo skaičiuotas pagal MSD tiesę nuo 2 ns iki 5 ns, tačiau šis regionas *Lipid21* sistemoms nėra tiesinis. Buvo pasirinktas alternatyvus intervalas nuo 6 ns iki 12 ns (žr. 12 pav.), kuriame visos sistemos turi mažą arba patenkinamą *D* paklaidą (žr. 2 lentelė).

*Lipid14* L<sub>d</sub> sistemos difuzijos koeficientas BODIPY-PM molekulei yra labai aukštas. Taip gali būti dėl mažesnės tarpmolekulinės sąveikos, tačiau to priežastys nėra aiškios. Difuzijos koeficientas apskaičiuotas nuo 6 ns iki 12 ns puikiai koreliuoja pagal molinę masę (*M*) su kitų jutiklių difuzijos koeficientais iš [44] straipsnio (žr. 2 lentelė). Kuo bus didesnė molekulės masė, tuo bus mažesnis difuzijos koeficientas.

2 lentelė. **Difuzijos koeficientas įvairioms sistemoms** (paryškintais skaičiais pažymėtos molekulės ir atitinkami rezultatai iš [44] straipsnio palyginimui, 293 K temperatūra)

Molekulė	<i>M</i> , g/mol	Fazė	Simuliacija			Eksperimentas
			Jėgų laukas	MSD regionas	<i>D</i> , 10 <sup>-8</sup> · cm <sup>2</sup> /s	<i>D</i> , 10 <sup>-8</sup> · cm <sup>2</sup> /s
BODIPY-PM	601	L <sub>d</sub>	Lipid14	2 – 5 ns	12,56 ± 2,03	–
				6 – 12 ns	7,43 ± 1,41	
		L <sub>o</sub>	Lipid21	6 – 12 ns	3,97 ± 0,31	
				6 – 12 ns	3,08 ± 0,03	
<b>1</b> (BODIPY-C <sub>10</sub> )	424	L <sub>d</sub>	Lipid14	2 – 5 ns	10,22	10,52
<b>2</b>	512			2 – 5 ns	7,52	8,75
<b>3</b>	629			2 – 5 ns	7,06	7,25



14 pav. **BODIPY-PM vidutinio kvadratinio poslinkio priklausomybė nuo laiko**  
(juodos linijos žymi tiesinius regionus, naudotus  $D$  skaičiavimams)

BODIPY-PM difuzijos koeficientai apskaičiuoti *Lipid21* sistemai yra daug mažesni lyginant su dydžiais literatūroje ir su *Lipid14* sistema. To priežastis gali būti tankesnis lipidų išsidėstymas, nes *Lipid21* turi mažesnę plotą tenkantį vienam lipidui.

## 4. Išvados

1. Dviejų skirtingų jutiklio orientacijų membranos plokštumos atžvilgiu egzistavimas gali paaiškinti jutiklio biekspontinį gesimą; skirtingi BODIPY pasvirimo kampai suvaržo jutiklį nevienodai, todėl gali pasikeisti potenciali energijos paviršius.
2.  $L_o$  fazėje BODIPY-PM apskaičiuotas difuzijos koeficientas yra mažesnis negu  $L_d$  fazėje, todėl galima teigti, jog  $L_o$  fazės klampa yra didesnė negu  $L_d$  fazės.
3. Klamos padidėjimą paaiškina tvarkingesnė  $L_o$  fazės membranos struktūra ir papildoma BODIPY sąveika su cholesterolio molekulėmis.

# Padėka

Darbe buvo naudotas Vilniaus universiteto aukšto našumo superkompiuteris „VU HPC“ Fizikos fakulteto dalyje.

# Literatūra

- [1] A.C.S. Alves, R.A. Dias, L.P. Kagami, G.M. das Neves, F.C. Torres, V.L. Eifler-Lima, I. Carvalho, C. de M. Silva, D.F. Kawano, Beyond the “Lock and Key” Paradigm: Targeting Lipid Rafts to Induce the Selective Apoptosis of Cancer Cells, *Curr. Med. Chem.* 25 (2018) 2082–2104. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180111100601>.
- [2] C. Gajate, F. Mollinedo, Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts, *Blood* 109 (2007) 711–719. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-016824>.
- [3] Y. Wu, M. Štefl, A. Olzyńska, M. Hof, G. Yahioglu, P. Yip, D.R. Casey, O. Ces, J. Humpolíčková, M.K. Kuimova, Molecular rheometry: direct determination of viscosity in Lo and Ld lipid phases via fluorescence lifetime imaging, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 14986–14993. <https://doi.org/10.1039/C3CP51953H>.
- [4] A. Polita, M. Stancikaitė, R. Žvirblis, K. Maleckaitė, J. Dodonova-Vaitkūnienė, S. Tumkevičius, A.P. Shivabalan, G. Valinčius, Designing a green-emitting viscosity-sensitive 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza- s -indacene (BODIPY) probe for plasma membrane viscosity imaging, *RSC Adv.* 13 (2023) 19257–19264. <https://doi.org/10.1039/D3RA04126C>.
- [5] F.B. Kosker, O. Aydin, K. Icoz, Simple Staining of Cells on a Chip, *Biosensors* 12 (2022) 1013. <https://doi.org/10.3390/bios12111013>.
- [6] H.A. Alturkistani, F.M. Tashkandi, Z.M. Mohammedsaleh, Histological Stains: A Literature Review and Case Study, *Glob. J. Health Sci.* 8 (2016) 72–79. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n3p72>.
- [7] C. Gui, E. Zhao, R.T. K. Kwok, A.C. S. Leung, J.W. Y. Lam, M. Jiang, H. Deng, Y. Cai, W. Zhang, H. Su, B. Zhong Tang, AIE-active theranostic system: selective staining and killing of cancer cells, *Chem. Sci.* 8 (2017) 1822–1830. <https://doi.org/10.1039/C6SC04947H>.
- [8] S.J. Rodig, Cell Staining, *Cold Spring Harb. Protoc.* 2022 (2022) Pdb.top099606. <https://doi.org/10.1101/pdb.top099606>.
- [9] H.-R. Jia, Y.-X. Zhu, F.-G. Wu, Introduction: Fluorescent Materials for Cell Imaging, in: F.-G. Wu (Ed.), *Fluoresc. Mater. Cell Imaging*, Springer, Singapore, 2020: pp. 1–15. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-5062-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-5062-1_1).
- [10] R. Weissleder, A clearer vision for in vivo imaging: *Nature Biotechnology*, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 316. <https://doi.org/10.1038/86684>.
- [11] K. Maleckaitė, D. Narkevičius, R. Žilėnaitė, J. Dodonova-Vaitkūnienė, S. Toliautas, S. Tumkevičius, A. Vyšniauskas, Give or Take: Effects of Electron-Accepting/-Withdrawing Groups in Red-Fluorescent BODIPY Molecular Rotors, *Molecules* 27 (2021) 23. <https://doi.org/10.3390/molecules27010023>.
- [12] M. Hebditch, J. Warwicker, Web-based display of protein surface and pH-dependent properties for assessing the developability of biotherapeutics, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1969. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36950-8>.
- [13] J. Li, C. Yin, F. Huo, Development of fluorescent zinc chemosensors based on various fluorophores and their applications in zinc recognition, *Dyes Pigments* 131 (2016) 100–133. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.03.043>.
- [14] P.M. Douglass, L.L.E. Salins, E. Dikici, S. Daunert, Class-selective drug detection: fluorescently-labeled calmodulin as the biorecognition element for phenothiazines and

- tricyclic antidepressants, *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 1186–1192.  
<https://doi.org/10.1021/bc010080b>.
- [15] L. Di Costanzo, B. Panunzi, Visual pH Sensors: From a Chemical Perspective to New Bioengineered Materials, *Molecules* 26 (2021) 2952.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26102952>.
- [16] M. Homma, Y. Takei, A. Murata, T. Inoue, S. Takeoka, A ratiometric fluorescent molecular probe for visualization of mitochondrial temperature in living cells, *Chem. Commun.* 51 (2015) 6194–6197. <https://doi.org/10.1039/C4CC10349A>.
- [17] M.M. Ogle, A.D. Smith McWilliams, B. Jiang, A.A. Martí, Latest Trends in Temperature Sensing by Molecular Probes, *ChemPhotoChem* 4 (2020) 255–270.  
<https://doi.org/10.1002/cptc.201900255>.
- [18] H. Sunahara, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, Design and Synthesis of a Library of BODIPY-Based Environmental Polarity Sensors Utilizing Photoinduced Electron-Transfer-Controlled Fluorescence ON/OFF Switching, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 5597–5604. <https://doi.org/10.1021/ja068551y>.
- [19] H. Xiao, P. Li, B. Tang, Recent progresses in fluorescent probes for detection of polarity, *Coord. Chem. Rev.* 427 (2021) 213582.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213582>.
- [20] M. Kubánková, I. López-Duarte, D. Kiryushko, M.K. Kuimova, Molecular rotors report on changes in live cell plasma membrane microviscosity upon interaction with beta-amyloid aggregates, *Soft Matter* 14 (2018) 9466–9474.  
<https://doi.org/10.1039/C8SM01633J>.
- [21] J.E. Chambers, M. Kubánková, R.G. Huber, I. López-Duarte, E. Avezov, P.J. Bond, S.J. Marciniak, M.K. Kuimova, An Optical Technique for Mapping Microviscosity Dynamics in Cellular Organelles, *ACS Nano* 12 (2018) 4398–4407.  
<https://doi.org/10.1021/acsnano.8b00177>.
- [22] H. Xiao, P. Li, B. Tang, Small Molecular Fluorescent Probes for Imaging of Viscosity in Living Biosystems, *Chem. – Eur. J.* 27 (2021) 6880–6898.  
<https://doi.org/10.1002/chem.202004888>.
- [23] R. Datta, T.M. Heaster, J.T. Sharick, A.A. Gillette, M.C. Skala, Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications, *J. Biomed. Opt.* 25 (2020) 071203.  
<https://doi.org/10.1117/1.JBO.25.7.071203>.
- [24] J. Chmeliov, V. Butkus, L. Valkūnas, *Kvantinė fizika*, Vilniaus universiteto leidykla, Vilnius, 2020.
- [25] A. Polita, S. Toliautas, R. Žvirblis, A. Vyšniauskas, The effect of solvent polarity and macromolecular crowding on the viscosity sensitivity of a molecular rotor BODIPY-C<sub>10</sub>, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22 (2020) 8296–8303.  
<https://doi.org/10.1039/C9CP06865A>.
- [26] Z. Lin, A.W. Kohn, T. Van Voorhis, Toward Prediction of Nonradiative Decay Pathways in Organic Compounds II: Two Internal Conversion Channels in BODIPYs, *J. Phys. Chem. C* 124 (2020) 3925–3938. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b08292>.
- [27] J.M. Remington, A.M. Philip, M. Hariharan, B. Kohler, On the origin of multiexponential fluorescence decays from 2-aminopurine-labeled dinucleotides, *J. Chem. Phys.* 145 (2016) 155101. <https://doi.org/10.1063/1.4964718>.
- [28] J.A. Levitt, P.-H. Chung, M.K. Kuimova, G. Yahioglu, Y. Wang, J. Qu, K. Suhling, Fluorescence Anisotropy of Molecular Rotors, *ChemPhysChem* 12 (2011) 662–672.  
<https://doi.org/10.1002/cphc.201000782>.
- [29] A. Vyšniauskas, I. López-Duarte, N. Duchemin, T.-T. Vu, Y. Wu, E.M. Budynina, Y.A. Volkova, E. Peña Cabrera, D.E. Ramírez-Ornelas, M.K. Kuimova, Exploring viscosity,

- polarity and temperature sensitivity of BODIPY-based molecular rotors, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (2017) 25252–25259. <https://doi.org/10.1039/C7CP03571C>.
- [30] I.S. Yadav, R. Misra, Design, synthesis and functionalization of BODIPY dyes: applications in dye-sensitized solar cells (DSSCs) and photodynamic therapy (PDT), *J. Mater. Chem. C* 11 (2023) 8688–8723. <https://doi.org/10.1039/D3TC00171G>.
- [31] A. Loudet, K. Burgess, BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties, *Chem. Rev.* 107 (2007) 4891–4932. <https://doi.org/10.1021/cr078381n>.
- [32] Q. Ou, Q. Peng, Z. Shuai, Toward Quantitative Prediction of Fluorescence Quantum Efficiency by Combining Direct Vibrational Conversion and Surface Crossing: BODIPYs as an Example, *J. Phys. Chem. Lett.* 11 (2020) 7790–7797. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.0c02054>.
- [33] L.M. Rebelo, J.S. de Sousa, J. Mendes Filho, M. Radmacher, Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy, *Nanotechnology* 24 (2013) 055102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/5/055102>.
- [34] G.S. Zubenko, U. Kopp, T. Seto, L.L. Firestone, Platelet membrane fluidity individuals at risk for Alzheimer's disease: a comparison of results from fluorescence spectroscopy and electron spin resonance spectroscopy, *Psychopharmacology (Berl.)* 145 (1999) 175–180. <https://doi.org/10.1007/s002130051046>.
- [35] O. Nadiv, M. Shinitzky, H. Manu, D. Hecht, C.T. Roberts Jr, D. LeRoith, Y. Zick, Elevated protein tyrosine phosphatase activity and increased membrane viscosity are associated with impaired activation of the insulin receptor kinase in old rats, *Biochem. J.* 298 (1994) 443–450. <https://doi.org/10.1042/bj2980443>.
- [36] S. Toliautas, J. Dodonova, A. Žvirblis, I. Čiplys, A. Polita, A. Devižis, S. Tumkevičius, J. Šulskus, A. Vyšniauskas, Enhancing the Viscosity-Sensitive Range of a BODIPY Molecular Rotor by Two Orders of Magnitude, *Chem. – Eur. J.* 25 (2019) 10342–10349. <https://doi.org/10.1002/CHEM.201901315>.
- [37] Á.G. Solaesa, S.L. Bucio, M.T. Sanz, S. Beltrán, S. Rebolleda, Characterization of Triacylglycerol Composition of Fish Oils by Using Chromatographic Techniques, *J. Oleo Sci.* 63 (2014) 449–460. <https://doi.org/10.5650/jos.ess13202>.
- [38] Oleic acid | Definition, Uses, & Structure | Britannica, (2024). <https://www.britannica.com/science/oleic-acid> (accessed January 15, 2024).
- [39] A. Barba-Bon, M. Nilam, A. Hennig, Supramolecular Chemistry in the Biomembrane, *ChemBioChem* 21 (2020) 886–910. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900646>.
- [40] Z. Korade, A.K. Kenworthy, Lipid rafts, cholesterol, and the brain, *Neuropharmacology* 55 (2008) 1265–1273. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.02.019>.
- [41] J. Frallicciardi, J. Melcr, P. Siginou, S.J. Marrink, B. Poolman, Membrane thickness, lipid phase and sterol type are determining factors in the permeability of membranes to small solutes, *Nat. Commun.* 13 (2022) 1605. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29272-x>.
- [42] J.F. Nagle, R.M. Venable, E. Maroclo-Kemmerling, S. Tristram-Nagle, P.E. Harper, R.W. Pastor, Revisiting Volumes of Lipid Components in Bilayers, *J. Phys. Chem. B* 123 (2019) 2697–2709. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.8b12010>.
- [43] I.E. Steinmark, A.L. James, P.-H. Chung, P.E. Morton, M. Parsons, C.A. Dreiss, C.D. Lorenz, G. Yahioğlu, K. Suhling, Targeted fluorescence lifetime probes reveal responsive organelle viscosity and membrane fluidity, *PLOS ONE* 14 (2019) e0211165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211165>.
- [44] M.R. Dent, I. López-Duarte, C.J. Dickson, N.D. Geoghegan, J.M. Cooper, I.R. Gould, R. Krams, J.A. Bull, N.J. Brooks, M.K. Kuimova, Imaging phase separation in model



- lipid membranes through the use of BODIPY based molecular rotors, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 18393–18402. <https://doi.org/10.1039/C5CP01937K>.
- [45] J.T. Mika, A.J. Thompson, M.R. Dent, N.J. Brooks, J. Michiels, J. Hofkens, M.K. Kuimova, Measuring the Viscosity of the *Escherichia coli* Plasma Membrane Using Molecular Rotors, *Biophys. J.* 111 (2016) 1528–1540. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.08.020>.
- [46] M. Olšinová, P. Jurkiewicz, M. Pozník, R. Šachl, T. Prausová, M. Hof, V. Kozmík, F. Teplý, J. Svoboda, M. Cebecauer, Di- and tri-oxalkyl derivatives of a boron dipyrromethene (BODIPY) rotor dye in lipid bilayers, *Phys Chem Chem Phys* 16 (2014) 10688–10697. <https://doi.org/10.1039/C4CP00888J>.
- [47] E.G. Lewars, *Computational Chemistry*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2011. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3862-3>.
- [48] P. Bauer, B. Hess, E. Lindahl, *GROMACS 2022.3 Manual*, (2022). <https://doi.org/10.5281/zenodo.7037337>.
- [49] D. Narkevičius, Fosfolipidinės membranos modeliavimas taikant molekulių dinamiką, Vilniaus universitetas, 2024.
- [50] J.W. Bats, *X-Ray diffraction and chemical bonding*, Twente University of Technology, 1976.
- [51] C.I. Bayly, P. Cieplak, W. Cornell, P.A. Kollman, A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 10269–10280. <https://doi.org/10.1021/j100142a004>.
- [52] P. Cieplak, W.D. Cornell, C. Bayly, P.A. Kollman, Application of the multimolecule and multiconformational RESP methodology to biopolymers: Charge derivation for DNA, RNA, and proteins, *J. Comput. Chem.* 16 (1995) 1357–1377. <https://doi.org/10.1002/jcc.540161106>.
- [53] W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 5179–5197. <https://doi.org/10.1021/ja00124a002>.
- [54] V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, C. Simmerling, Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 65 (2006) 712–725. <https://doi.org/10.1002/prot.21123>.
- [55] X. He, V.H. Man, W. Yang, T.-S. Lee, J. Wang, A fast and high-quality charge model for the next generation general AMBER force field, *J. Chem. Phys.* 153 (2020) 114502. <https://doi.org/10.1063/5.0019056>.
- [56] C.J. Dickson, R.C. Walker, I.R. Gould, Lipid21: Complex Lipid Membrane Simulations with AMBER, *J. Chem. Theory Comput.* 18 (2022) 1726–1736. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c01217>.
- [57] M. Bacalum, L. Wang, S. Boodts, P. Yuan, V. Leen, N. Smisdom, E. Fron, S. Knippenberg, G. Fabre, P. Trouillas, D. Beljonne, W. Dehaen, N. Boens, M. Ameloot, A Blue-Light-Emitting BODIPY Probe for Lipid Membranes, *Langmuir* 32 (2016) 3495–3505. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00478>.
- [58] O. Berger, O. Edholm, F. Jähnig, Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature, *Biophys. J.* 72 (1997) 2002–2013. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78845-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78845-3).
- [59] R. Tjörnhammar, O. Edholm, Reparameterized United Atom Model for Molecular Dynamics Simulations of Gel and Fluid Phosphatidylcholine Bilayers, *J. Chem. Theory Comput.* 10 (2014) 5706–5715. <https://doi.org/10.1021/ct500589z>.

- [60] C. Oostenbrink, A. Villa, A.E. Mark, W.F. Van Gunsteren, A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1656–1676. <https://doi.org/10.1002/jcc.20090>.
- [61] M. Pederzoli, M. Wasif Baig, M. KÝvala, J. Pittner, L. Cwiklik, Photophysics of BODIPY-Based Photosensitizer for Photodynamic Therapy: Surface Hopping and Classical Molecular Dynamics, *J. Chem. Theory Comput.* 15 (2019) 5046–5057. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00533>.
- [62] J.P.M. Jámbeck, A.P. Lyubartsev, Derivation and Systematic Validation of a Refined All-Atom Force Field for Phosphatidylcholine Lipids, *J. Phys. Chem. B* 116 (2012) 3164–3179. <https://doi.org/10.1021/jp212503e>.
- [63] J. Wang, W. Wang, P.A. Kollman, D.A. Case, Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations, *J. Mol. Graph. Model.* 25 (2006) 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2005.12.005>.
- [64] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, Development and testing of a general amber force field, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>.
- [65] C.J. Dickson, B.D. Madej, Å.A. Skjevik, R.M. Betz, K. Teigen, I.R. Gould, R.C. Walker, Lipid14: The Amber Lipid Force Field, *J. Chem. Theory Comput.* 10 (2014) 865–879. <https://doi.org/10.1021/ct4010307>.
- [66] P. Bauer, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS 2022.3 Source code, (2022). <https://doi.org/10.5281/zenodo.7037338>.
- [67] D.A. Case, H.M. Aktulga, K. Belfon, D.S. Cerutti, G.A. Cisneros, V.W.D. Cruzeiro, N. Forouzes, T.J. Giese, A.W. Götz, H. Gohlke, S. Izadi, K. Kasavajhala, M.C. Kaymak, E. King, T. Kurtzman, T.-S. Lee, P. Li, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, M. Manathunga, M.R. Machado, H.M. Nguyen, K.A. O’Hearn, A.V. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, A. Rahnamoun, A. Risheh, S. Schott-Verdugo, A. Shajan, J. Swails, J. Wang, H. Wei, X. Wu, Y. Wu, S. Zhang, S. Zhao, Q. Zhu, T.E.I. Cheatham, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Simmerling, D.M. York, M.C. Nagan, K.M.Jr. Merz, AmberTools, *J. Chem. Inf. Model.* 63 (2023) 6183–6191. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c01153>.
- [68] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, A. DiNola, J.R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684–3690. <https://doi.org/10.1063/1.448118>.
- [69] M. Parrinello, A. Rahman, Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method, *J. Appl. Phys.* 52 (1981) 7182–7190. <https://doi.org/10.1063/1.328693>.
- [70] M. Bernetti, G. Bussi, Pressure control using stochastic cell rescaling, *J. Chem. Phys.* 153 (2020) 114107. <https://doi.org/10.1063/5.0020514>.
- [71] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.* 79 (1983) 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- [72] I.S. Joung, T.E.I. Cheatham, Determination of Alkali and Halide Monovalent Ion Parameters for Use in Explicitly Solvated Biomolecular Simulations, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 9020–9041. <https://doi.org/10.1021/jp8001614>.
- [73] S. Jo, T. Kim, V.G. Iyer, W. Im, CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM, *J. Comput. Chem.* 29 (2008) 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.
- [74] V. Gapsys, D. Seeliger, B.L. de Groot, New Soft-Core Potential Function for Molecular Dynamics Based Alchemical Free Energy Calculations, *J. Chem. Theory Comput.* 8 (2012) 2373–2382. <https://doi.org/10.1021/ct300220p>.

- [75] W.F. Guthrie, NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods (NIST Handbook 151), (2020). <https://doi.org/10.18434/M32189>.
- [76] F.-Y. Dupradeau, A. Pigache, T. Zaffran, C. Savineau, R. Lelong, N. Grivel, D. Lelong, W. Rosanski, P. Cieplak, The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 7821. <https://doi.org/10.1039/c0cp00111b>.
- [77] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A.V. Marenich, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H.P. Hratchian, J.V. Ortiz, A.F. Izmaylov, J.L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V.G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J.J. Heyd, E.N. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T.A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A.P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J.B. Foresman, D.J. Fox, *Gaussian 16*, (2016).
- [78] J. Jebasingh Kores, I. Antony Danish, T. Sasitha, J. Gershom Stuart, E. Jimla Pushpam, J. Winfred Jebaraj, Spectral, NBO, NLO, NCI, aromaticity and charge transfer analyses of anthracene-9,10-dicarboxaldehyde by DFT, *Heliyon* 7 (2021) e08377. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08377>.
- [79] T. Lu, F. Chen, Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer, *J. Comput. Chem.* 33 (2012) 580–592. <https://doi.org/10.1002/jcc.22885>.
- [80] A. Tafi, M. Agamennone, P. Tortorella, S. Alcaro, C. Gallina, M. Botta, AMBER force field implementation of the boronate function to simulate the inhibition of  $\beta$ -lactamases by alkyl and aryl boronic acids, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 1134–1142. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.06.011>.
- [81] Å.A. Skjevik, B.D. Madej, R.C. Walker, K. Teigen, LIPID11: A Modular Framework for Lipid Simulations Using Amber, *J. Phys. Chem. B* 116 (2012) 11124–11136. <https://doi.org/10.1021/jp3059992>.
- [82] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- [83] D. Narkevičius, S. Toliautas, Predicting nonradiative decay barrier of BODIPY dye in polar environment by applying ONIOM multiscale method, *Lith. J. Phys.* 64 (2024). <https://doi.org/10.3952/physics.2024.64.1.2>.

## SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY  
FACULTY OF PHYSICS

DOMANTAS NARKEVIČIUS

### **A Model of Photoactive Molecular Sensor in Cell Membrane**

The immune system's ability to induce apoptosis in cancerous cells via lipid rafts is a promising avenue for cancer treatment. However, cancer cells with decayed rafts are unable to receive apoptosis signals. Therefore, studying lipid rafts, with their significant potential in developing anticancer drugs, could lead to novel therapeutic strategies.

In previous studies, visualisation and mapping viscosity of model lipid rafts using BODIPY-C<sub>12</sub> encountered some challenges. However, a significant breakthrough was achieved when Polita *et al.* experimentally investigated a modified next-generation BODIPY-PM sensor. However, the dye's positioning was unclear, and the resulting biexponential decays were unexplained. Therefore, this master's thesis aims to calculate the physical parameters of the lipid membrane with the BODIPY sensor by applying computational chemistry models, which would allow us to evaluate the performance of the embedded sensor. The following tasks were set:

1. Prepare a suitable molecular mechanics force field for the sensor and the lipid membrane,
2. Perform a molecular dynamics simulation at constant temperature and pressure,
3. Determine the orientation of the sensor in the lipid membrane and calculate the in-plane diffusion coefficient.

In this study, we conducted molecular dynamics simulations using adequately prepared gaff and Amber lipid force fields on the BODIPY-PM sensor, which was inserted into the lipid membrane. The simulations unveiled the existence of two states of tilted BODIPY-PM in the lipid membrane, shedding light on the sensor's biexponential decay. The different tilt angles of BODIPY-PM affect the sensor's behaviour, leading to a change in the potential energy surface. In the liquid-ordered phase, the diffusion coefficient of BODIPY-PM is lower than in the liquid-disordered phase, indicating a higher viscosity. This increase in viscosity is attributed to the more ordered structure of the membrane and the additional interaction of BODIPY with cholesterol molecules.

# 1 Priedas

; Rekomenduojami MD *.mdp* paleidimo nustatymai *Lipid14* ir *Lipid21* jėgų laukams.

```
integrator      = sd
dt             = 0.002
nsteps        = 150000000
nstenergy     = 5000
nstxout-compressed = 5000
pbc           = xyz
rlist         = 1.0
coulombtype   = PME
coulomb-modifier = Potential-shift
rcoulomb     = 1.0
vdwtype      = Cut-off
vdw-modifier  = Potential-shift
rvdw        = 1.0
DispCorr     = EnerPres
fourierspacing = 0.125
tc-grps      = Lipid Non-Lipid
tau-t        = 1.0 1.0
ref-t        = 293 293
pcoupl       = Parrinello-Rahman
pcoupltype   = semiisotropic
tau-p        = 10.0
compressibility = 4.46e-5 4.46e-5
ref-p        = 1.0 1.0
constraints   = h-bonds
constraint-algorithm = LINCS
continuation  = yes
```

## 2 Priedas

P.2 lentelė. **Apskaičiuotų su Gromacs lipidinės membranos parametrų palyginimas su Amber lipidų jėgų laukų literatūra** (raudonai paryškintos testo vertės viršijančios kritinę vertę, paryškintu tekstu pažymėti optimalūs nustatymai)

Lipid14															
Slėgio valdymas			Temperatūros grupių skaičius	Suvaržymai		Dydžiai apskaičiuoti su Gromacs			Dydžiai apskaičiuoti straipsnyje			Statistinių testų įverčiai			
Bariostatas	$\tau_p$	Dėžės tipas		Algoritmas	Eilė	Vidurkis	$s$	$n$	Vidurkis	$s$	$n$	$F_{\text{testo}}$	$F_{\text{kritinė}}$	$t_{\text{testo}}$	$t_{\text{kritinė}}$
<b>Membranos storis <math>D_{HH}</math></b>															
Parinelo-Rahmano	10	anizotropinis	2	LINCS	4	36,81	0,27	5	37,0	0,2	5	1,85	6,39	1,26	2,31
Berendseno	1	anizotropinis	2	LINCS	4	36,80	0,22					1,19		1,55	
Parinelo-Rahmano	5	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	36,79	0,22					1,18		1,56	
Parinelo-Rahmano	10	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	36,80	0,15					1,76		1,80	
Parinelo-Rahmano	10	anizotropinis	2	SHAKE	–	36,62	0,27					1,83		2,54	
Parinelo-Rahmano	5	anizotropinis	2	LINCS	4	36,52	0,28					1,90		3,13	
<b>Plotas tenkantis vienam lipidui <math>A_L</math></b>															
Parinelo-Rahmano	10	anizotropinis	2	LINCS	4	69,26	0,33	5	69,0	0,3	5	1,21	6,39	1,32	2,31
Berendseno	1	anizotropinis	2	LINCS	4	69,27	0,23					1,77		1,59	2,68
Parinelo-Rahmano	10	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	69,39	0,29					1,06		2,08	2,67
Parinelo-Rahmano	5	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	69,29	0,07					17,20		2,13	2,31
Parinelo-Rahmano	10	anizotropinis	2	SHAKE	–	69,52	0,28					1,11		2,83	
Parinelo-Rahmano	5	anizotropinis	2	LINCS	4	69,70	0,07					20,27		5,13	
<b>Tūris tenkantis vienam lipidui <math>V_L</math></b>															
Parinelo-Rahmano	5	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	1246,28	0,29	1249,6	0,2	5	2,03	6,28	21,78	2,27	
Parinelo-Rahmano	10	anisotropic	2	LINCS	4	1246,28	0,25				6,59	1,55	6,20	24,36	2,24
Parinelo-Rahmano	5	anizotropinis	2	LINCS	4	1246,36	0,21				6,46	1,07	6,21	26,70	2,25
Parinelo-Rahmano	10	anizotropinis	2	SHAKE	–	1246,26	0,21				6,97	1,06	6,17	27,99	2,23
Berendseno	1	anizotropinis	2	LINCS	4	1246,02	0,22				6,37	1,22	6,22	28,17	2,25
Parinelo-Rahmano	10	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	1246,12	0,19				6,99	1,10	4,54	30,52	2,23

### 3 Priedas

P.3 lentelė. **Apskaičiuotų su Gromacs lipidinės membranos parametrų palyginimas su Amber lipidų jėgų laukų literatūra** (raudonai paryškintos testo vertės viršijančios kritinę vertę, paryškintu tekstu pažymėti optimalūs nustatymai)

Lipid21																
Slėgio valdymas			Temperatūros grupių skaičius	Suvaržymai		Dydžiai apskaičiuoti su Gromacs			Dydžiai apskaičiuoti straipsnyje			Statistinių testų įverčiai				
Bariostatas	$\tau_p$	Dėžės tipas		Algoritmas	Eilė	Vidurkis	$s$	$n$	Vidurkis	$s$	$n$	$F_{\text{testo}}$	$F_{\text{kritinė}}$	$t_{\text{testo}}$	$t_{\text{kritinė}}$	
<b>Membranos storis <math>D_{HH}</math></b>																
Parinelo-Rahmano	10	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	38,00	0,52	3	38,00	0,41	3	1,62	19,00	0,01	2,78	
Berendseno	1	pusiau-izotropinis	2	SHAKE	–	38,32	0,43					1,09		0,94		
Parinelo-Rahmano	10	pusiau-izotropinis	2	SHAKE	–	38,38	0,37					1,22		1,18		
Berendseno	1	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	38,38	0,28					2,15		1,33		
Parinelo-Rahmano	5	pusiau-izotropinis	2	SHAKE	–	38,48	0,32					1,66		1,61		
Berendseno	1	pusiau-izotropinis	2	LINCS	6	38,44	0,16					6,90		1,72		
Berendseno	1	pusiau-izotropinis	1	SHAKE	–	38,51	0,29					2,06		1,78		
Parinelo-Rahmano	5	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	38,74	0,05					69,54		3,12		4,19
<b>Plotas tenkantis vienam lipidui <math>A_L</math></b>																
Parinelo-Rahmano	5	pusiau-izotropinis	2	SHAKE	–	66,73	0,43	3	66,95	0,20	3	4,73	19,00	0,81	2,78	
Parinelo-Rahmano	10	pusiau-izotropinis	2	SHAKE	–	66,73	0,34					2,81		0,97		
Berendseno	1	pusiau-izotropinis	2	SHAKE	–	66,64	0,33					2,78		1,38		
Parinelo-Rahmano	10	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	66,70	0,16					1,53		1,69		
Berendseno	1	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	66,53	0,24					1,48		2,29		
Parinelo-Rahmano	5	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	66,61	0,09					5,02		2,71		
Berendseno	1	pusiau-izotropinis	1	SHAKE	–	66,48	0,20					1,03		2,83		
Berendseno	1	pusiau-izotropinis	2	LINCS	6	66,44	0,10					3,76		3,92		
<b>Tūris tenkantis vienam lipidui <math>V_L</math></b>																
Parinelo-Rahmano	10	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	1242,29	0,21	4,58	1232,84	0,07	3	9,22	19,22	72,61	2,49	
Berendseno	1	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	1242,33	0,19	4,27				7,60	19,19	79,69	2,53	
Berendseno	1	pusiau-izotropinis	2	SHAKE	–	1242,49	0,16	4,73				5,47	19,23	94,51	2,48	
Parinelo-Rahmano	5	pusiau-izotropinis	2	SHAKE	–	1242,63	0,16	4,73				5,13	19,23	98,59	2,48	
Parinelo-Rahmano	10	pusiau-izotropinis	2	SHAKE	–	1242,62	0,16	4,86				5,10	19,24	98,89	2,46	
Parinelo-Rahmano	5	pusiau-izotropinis	2	LINCS	4	1242,54	0,14	4,99				3,93	19,25	110,38	2,45	
Berendseno	1	pusiau-izotropinis	2	LINCS	6	1242,30	0,12	4,55				2,95	19,22	121,27	2,50	
Berendseno	1	pusiau-izotropinis	1	SHAKE	–	1242,51	0,10	3,10				2,05	19,02	137,60	2,75	

## 4 Priedas

P.4 lentelė. Įvairių ciklinių junginių aromatiškumo įvertinimas (skaičiavimams naudota DFT teorija su B3LYP/6-311G++(d,p) funkcionalu ir funkcijų baze, trumpinių paaiškinimai pateikti žemiau)

Molekulė	Žiedas	Daugiacentrinio ryšio eilė	Normalizuota ryšio eilė	PDI	FLU	PLR	HOMA	Hiukelio aromatiškumo taisyklės
Benzenas	–	0,0961	0,6768	0,1046	0,0000	0,6284	0,9885	Aromatinis
Antraceno-9,10-dikarboksialdehidas	Kairinis	0,0465	0,5996	0,0688	0,0168	0,3821	0,6233	Aromatinis
	Centrinis	0,0386	0,5813	0,0549	0,0213	0,3652	0,5673	Aromatinis
	Dešininis	0,0464	0,5995	0,0688	0,0168	0,3821	0,6233	Aromatinis
Cikloheksa-1,4-dienas [78]	–	0,0305	0,5591	0,0237	0,0591	0,0560	-1,6208	Nearomatinis
BODIPY	Kairinis	0,0674	0,5830	N/A	0,0171	N/A	0,8590	Aromatinis
	Centrinis	-0,0025	-0,3679	0,0182	0,0706	0,0584	0,2209	Nearomatinis
	Dešininis	0,0674	0,5830	N/A	0,0171	N/A	0,8590	Aromatinis
Cikloheksanas	–	0,0006	0,2897	0,0139	0,0577	0,0208	-4,6580	Nearomatinis

Sutrumpinimų paaiškinimai:

CLRK – kondensuoto tiesinio atsako branduolys (*angl.* condensed linear response kernel)

PDI – para delokalizacijos indeksas (*angl.* para-delocalization index)

FLU – aromatinių fliukciacijų indeksas (*angl.* aromatic fluctuation index)

PLR – para tiesinio atsako indeksas (*angl.* para linear response index)

HOMA – harmoninio osciliatoriaus įvertis aromatiškumui (*angl.* harmonic oscillator measure of aromaticity)



## 5 Priedas

P.5 lentelė. **BODIPY-NMe2** optimalios geometrijos palyginimas tarp MM ir QM metodų, MM taikant skirtingų atomų tipus bei jėgų laukus (trumpinių paaiškinimai pateikti žemiau, paryškinta kombinacija naudota tolimesniame tyrime)

Ryšų ilgiai						Kampai						Dvisieniai kampai					
Atomų tipų kombinacija	Jėgų laukas	AD, Å	AD / n, Å	SD, Å <sup>2</sup>	SD / n, Å <sup>2</sup>	Atomų tipų kombinacija	Jėgų laukas	AD, °	AD / n, °	SD, (°) <sup>2</sup>	SD / n, (°) <sup>2</sup>	Atomų tipų kombinacija	Jėgų laukas	AD, °	AD / n, °	SD, (°) <sup>2</sup>	SD / n, (°) <sup>2</sup>
B	gaff	0,80	0,0181	0,0549	0,00125	<b>A</b>	<b>gaff</b>	90	1,21	268	3,58	<b>A</b>	<b>gaff</b>	701	6,49	13700	127
<b>A</b>	<b>gaff</b>	0,83	0,0188	0,0578	0,00131	B	gaff	92	1,23	238	3,18	E	gaff	701	6,50	13700	127
B	gaff2	0,87	0,0197	0,0547	0,00124	F	gaff	95	1,26	232	3,10	D	gaff	702	6,50	13400	124
C	gaff	0,87	0,0199	0,0581	0,00132	A	gaff2	97	1,29	278	3,70	F	gaff	733	6,79	14100	130
D	gaff	0,88	0,0200	0,0581	0,00132	E	gaff	98	1,30	283	3,77	B	gaff	734	6,79	14000	130
D	gaff2	0,94	0,0213	0,0607	0,00138	C	gaff	109	1,45	360	4,80	C	gaff	745	6,89	14600	135
A	gaff2	0,95	0,0216	0,0617	0,00140	B	gaff2	110	1,46	286	3,82	F	gaff2	847	7,84	12900	119
C	gaff2	0,96	0,0218	0,0586	0,00133	D	gaff	111	1,49	366	4,88	D	gaff2	1130	10,40	28700	266
F	gaff	1,01	0,0229	0,0675	0,00153	E	gaff2	119	1,58	351	4,68	E	gaff2	1160	10,70	34600	321
E	gaff	1,05	0,0238	0,0703	0,00160	C	gaff2	122	1,62	407	5,42	A	gaff2	1160	10,80	35000	324
F	gaff2	1,05	0,0238	0,0670	0,00152	D	gaff2	122	1,63	390	5,20	B	gaff2	1210	11,20	35000	324
E	gaff2	1,16	0,0263	0,0728	0,00165	F	gaff2	140	1,86	465	6,19	C	gaff2	1230	11,40	34500	320

### Paaiškinimai:

AD – absoliutusias nuokrypis, SD – kvadratinis nuokrypis,  $n$  – pasirinkto parametro (ilgių arba kampų arba dvisienių kampų) skaičius molekulėje. Atomų tipai sugeneruoti Antechamber nebuvo keisti, išskyrus atomus C<sub>1</sub> C<sub>2</sub> C<sub>3</sub> C<sub>4</sub> C<sub>5</sub> C<sub>6</sub> C<sub>7</sub> C<sub>8</sub> C<sub>9</sub> (žr. numeraciją 7 pav.), kurie atitinka šiuos atomų tipus:

A: cd cd cc cc ce cc cc cd cd – atitinka pasukto pirolo molekulės atomų tipus.

B: cd cd cc cc cf cc cc cd cd – atitinka pasukto pirolo molekulės atomų tipus.

C: cc cc cc cd ce cc cc cd cd – originalūs atomų tipai parinkti Antechamber, C<sub>5</sub> atomo tipas pakeistas į panašų.

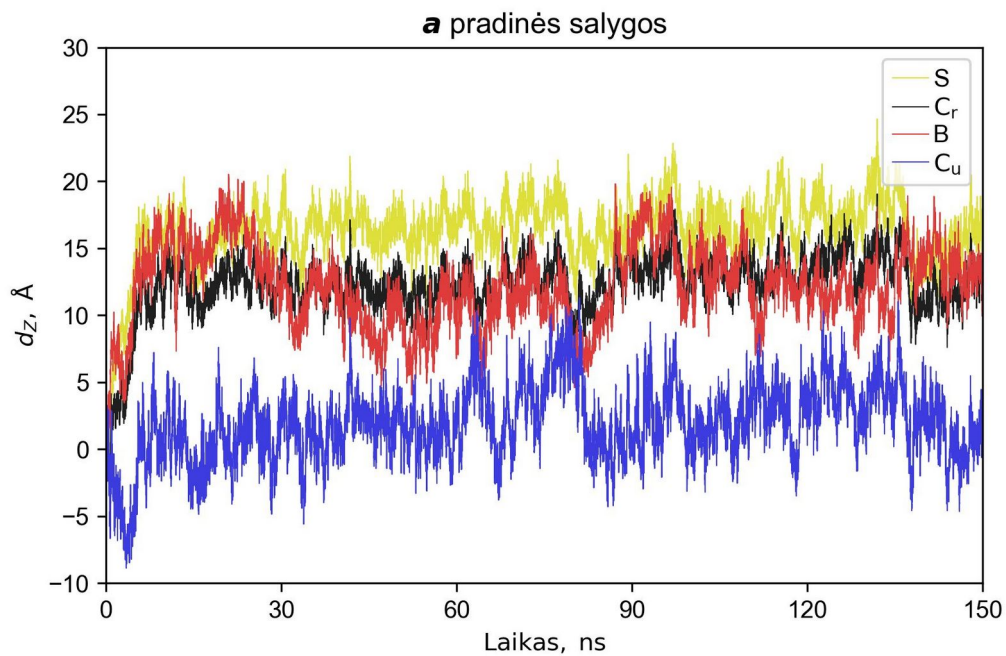
D: cc cc cc cd cf cc cc cd cd – originalūs atomų tipai parinkti Antechamber.

E: cc cd cd cc ce cc cd cd cc – atitinka pirolo molekulės atomų tipus.

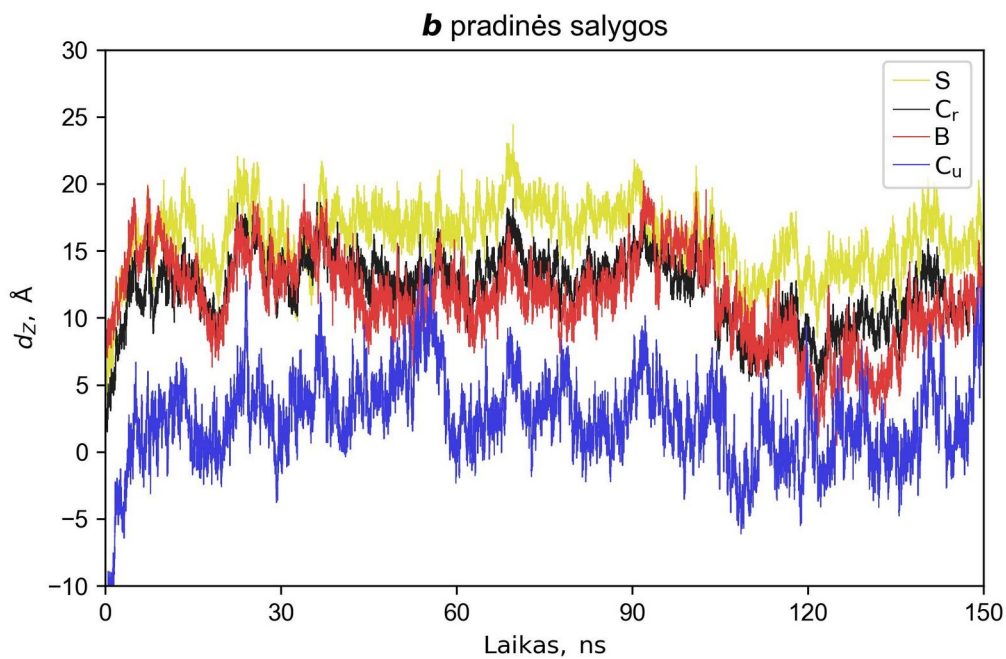
F: cc cd cd cc cf cc cd cd cc – atitinka pirolo molekulės atomų tipus.

## 6 Priedas

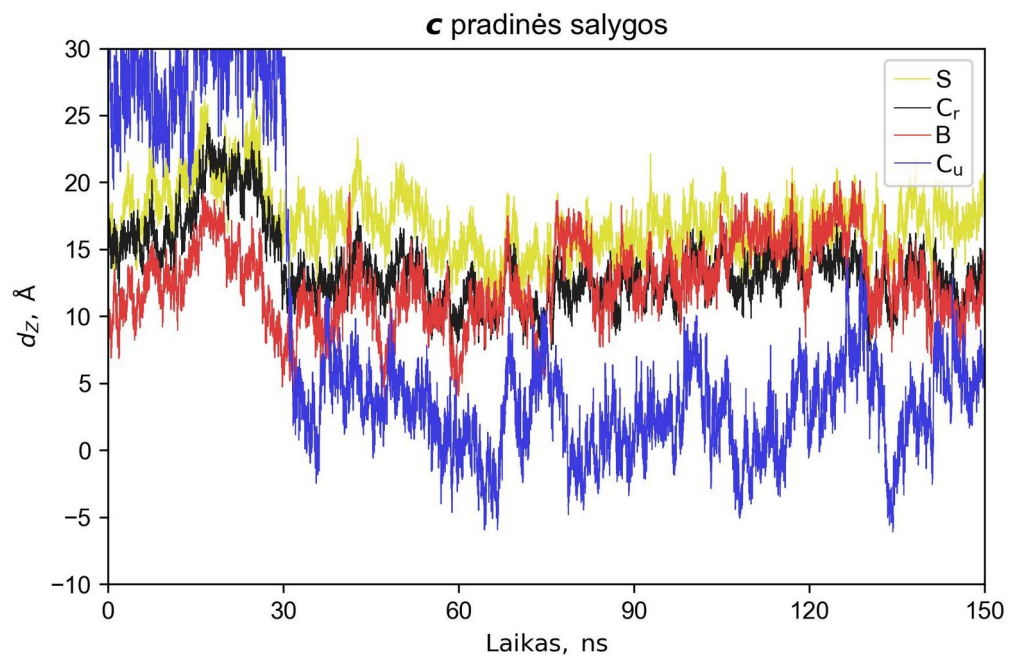
$L_d$  fazės *Lipid14* sistemos jutiklio atomų atstumo nuo membranos masės centro priklausomybė nuo simuliacijos laiko. Skirtingi grafikai atitinka skirtingas pradines sąlygas.



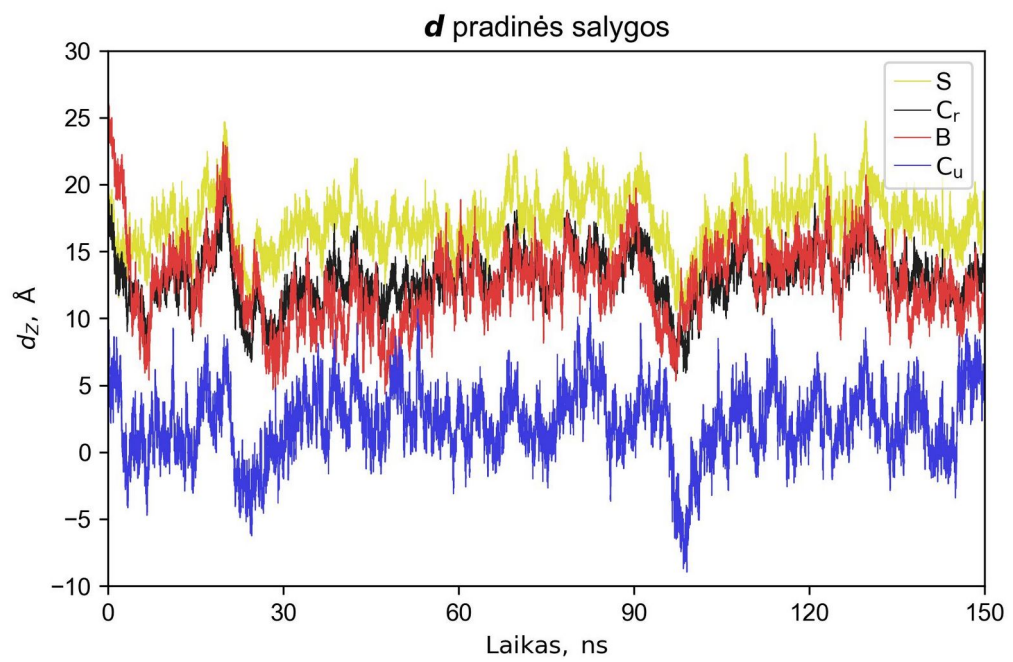
P6.1 pav.



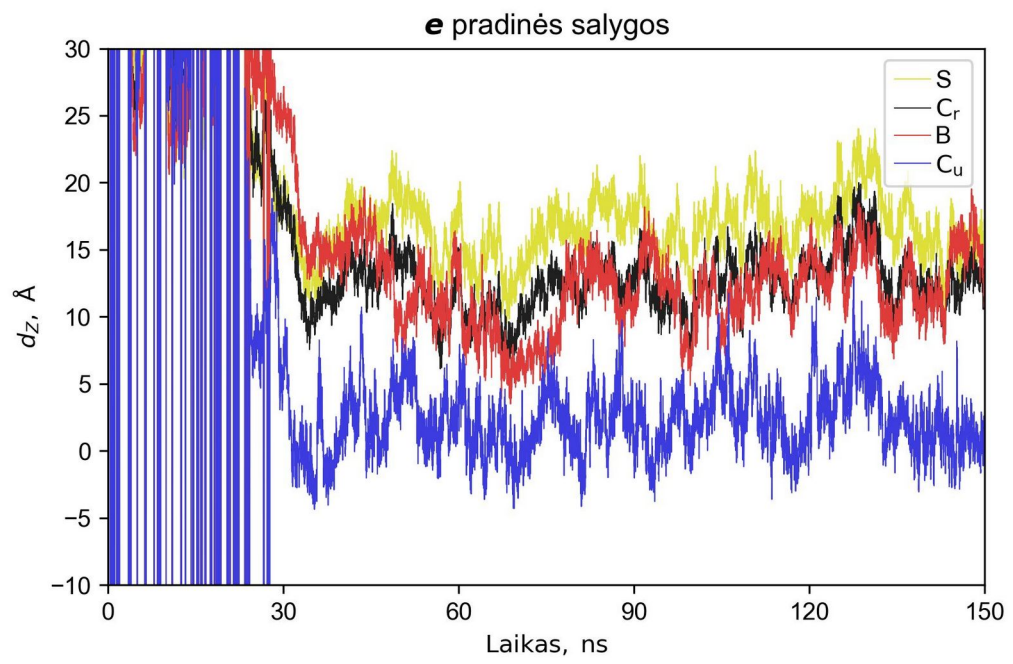
P6.2 pav.



P6.3 pav.



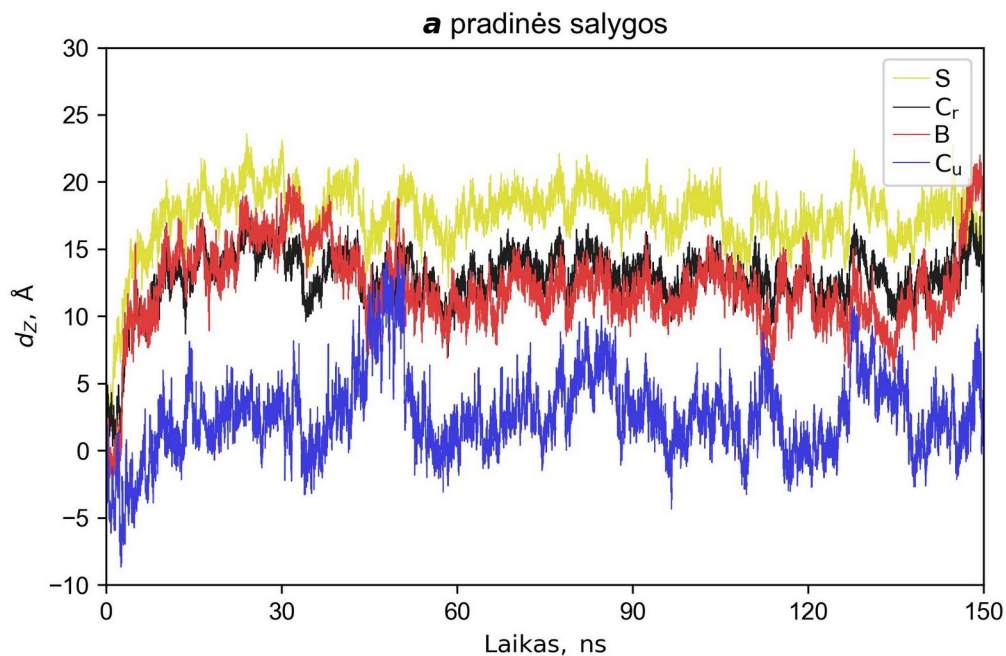
P6.4 pav.



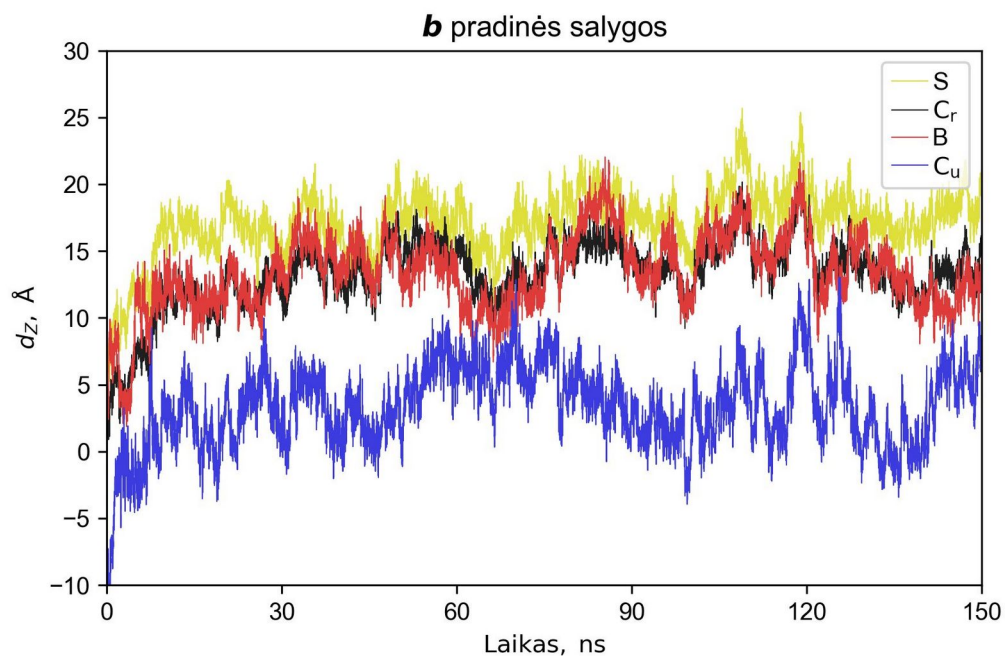
P6.5 pav.

## 7 Priedas

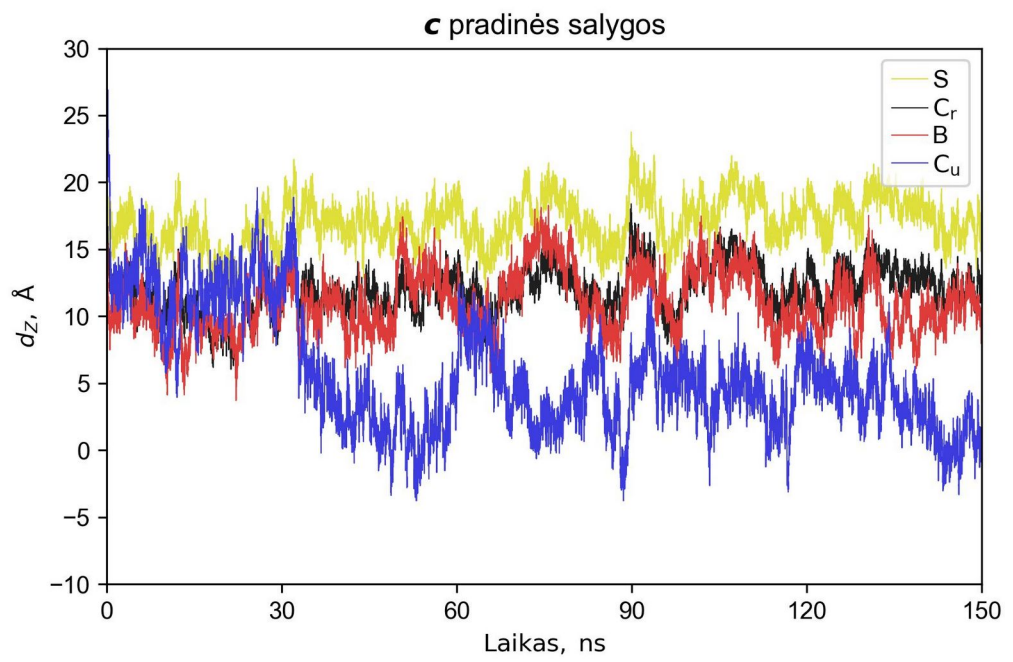
$L_d$  fazės *Lipid21* sistemos jutiklio atomų atstumo nuo membranos masės centro priklausomybė nuo simuliacijos laiko. Skirtingi grafikai atitinka skirtingas pradines sąlygas.



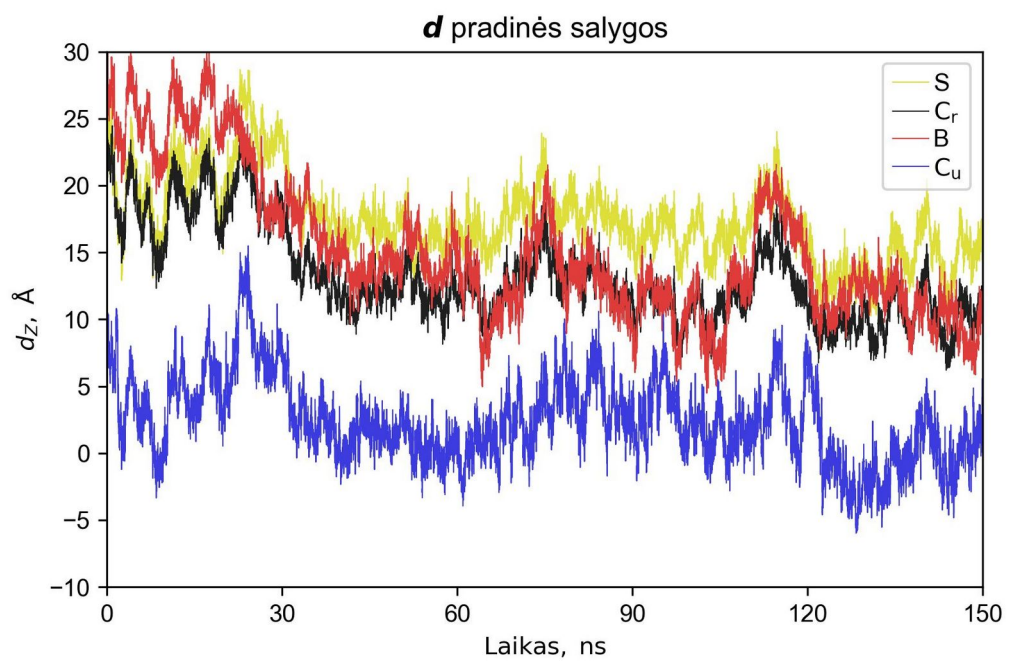
P7.1 pav.



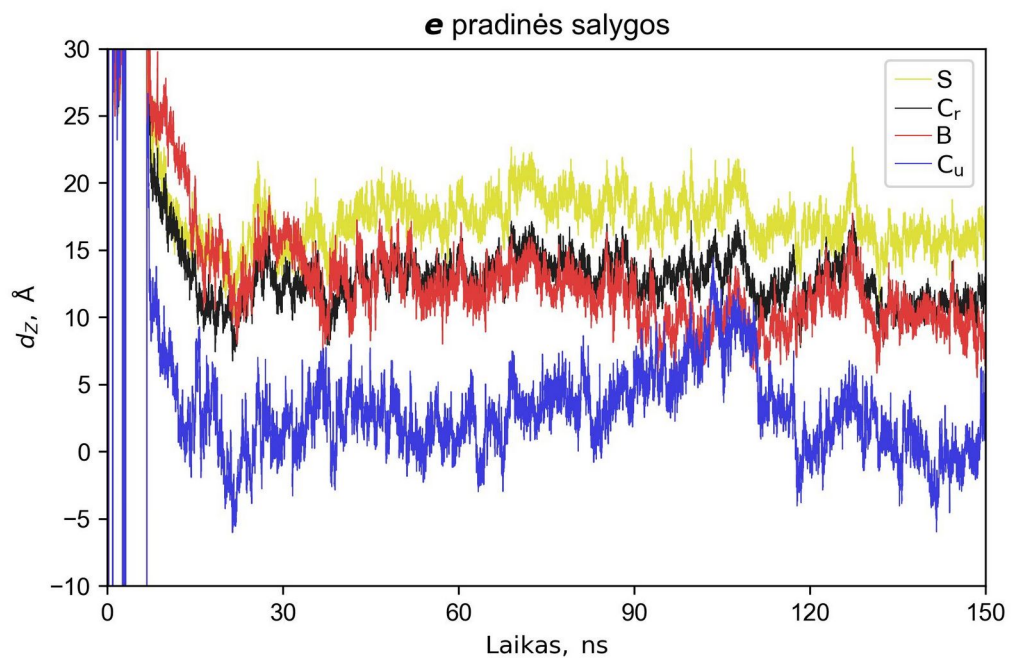
P7.2 pav.



P7.3 pav.



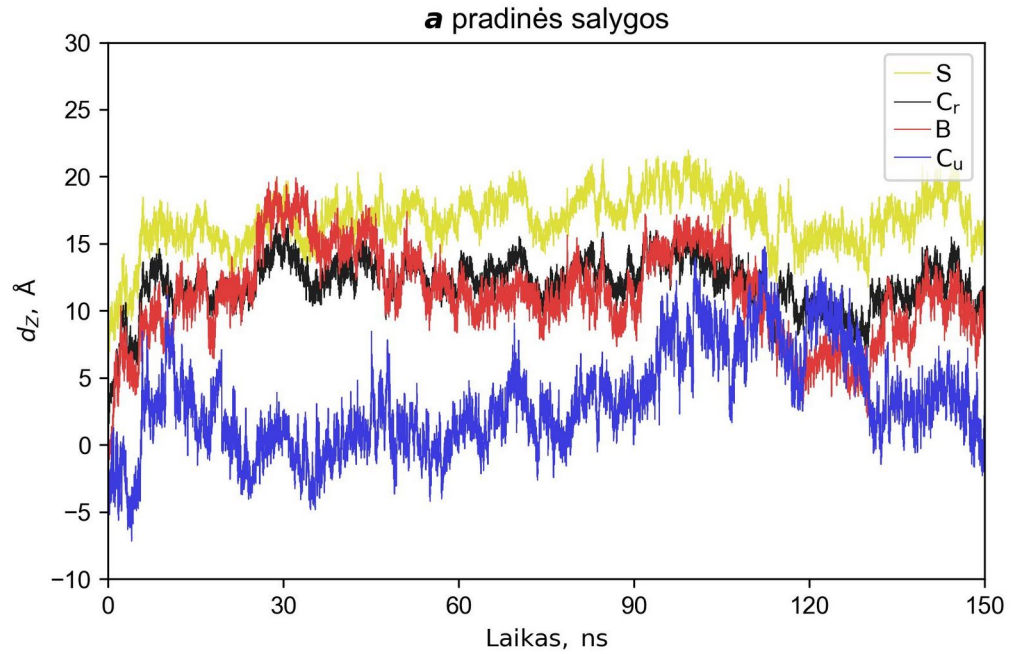
P7.4 pav.



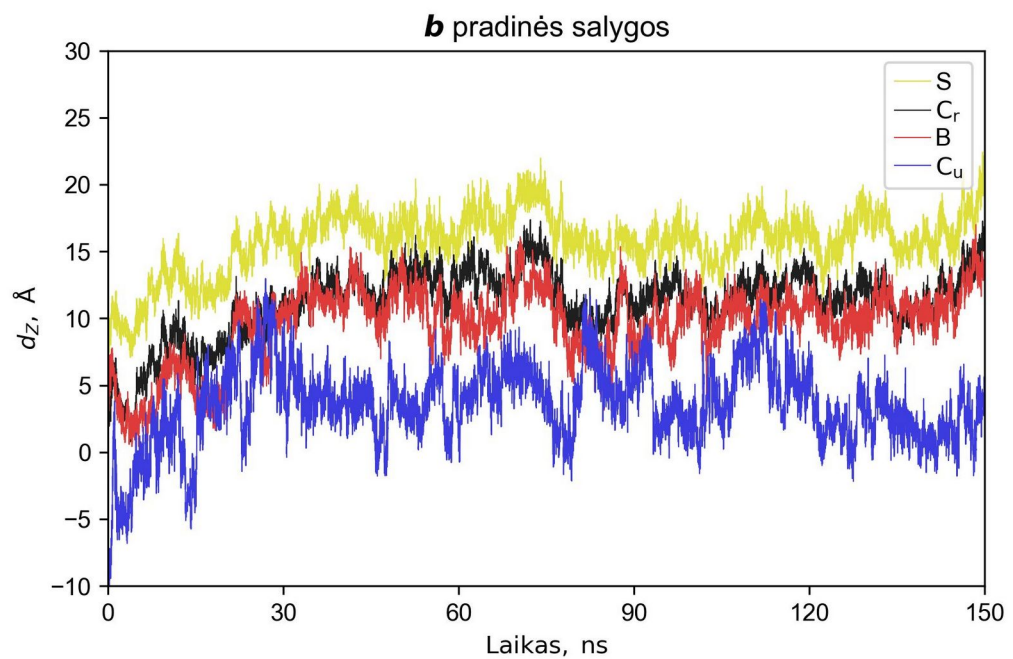
P7.5 pav.

## 8 Priedas

$L_o$  fazės *Lipid21* sistemos jutiklio atomų atstumo nuo membranos masės centro priklausomybė nuo simuliacijos laiko. Skirtingi grafikai atitinka skirtingas pradines sąlygas.

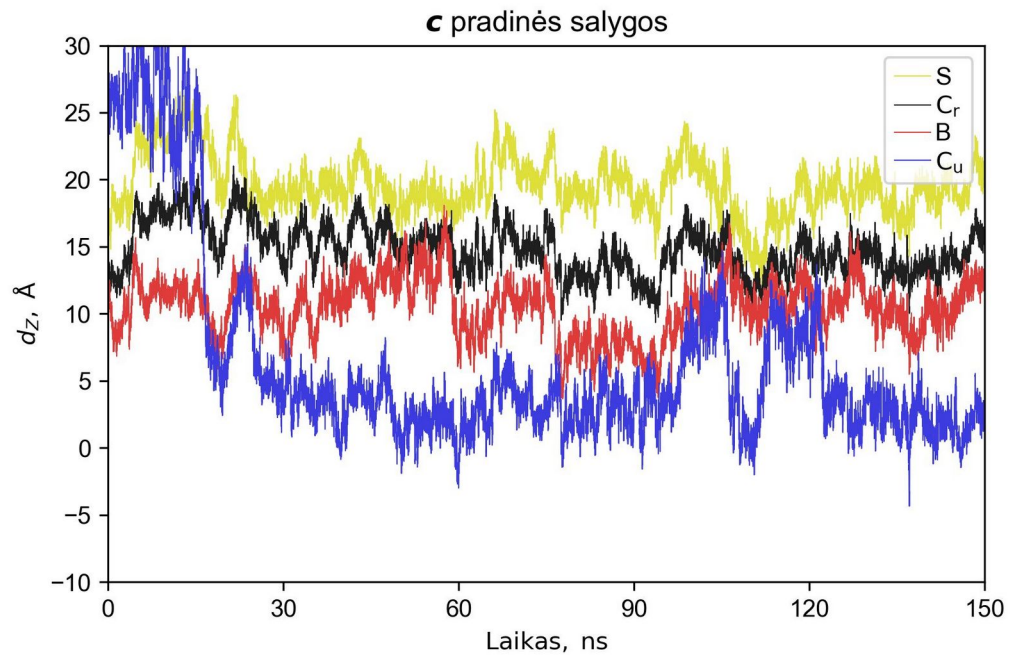


P8.1 pav.

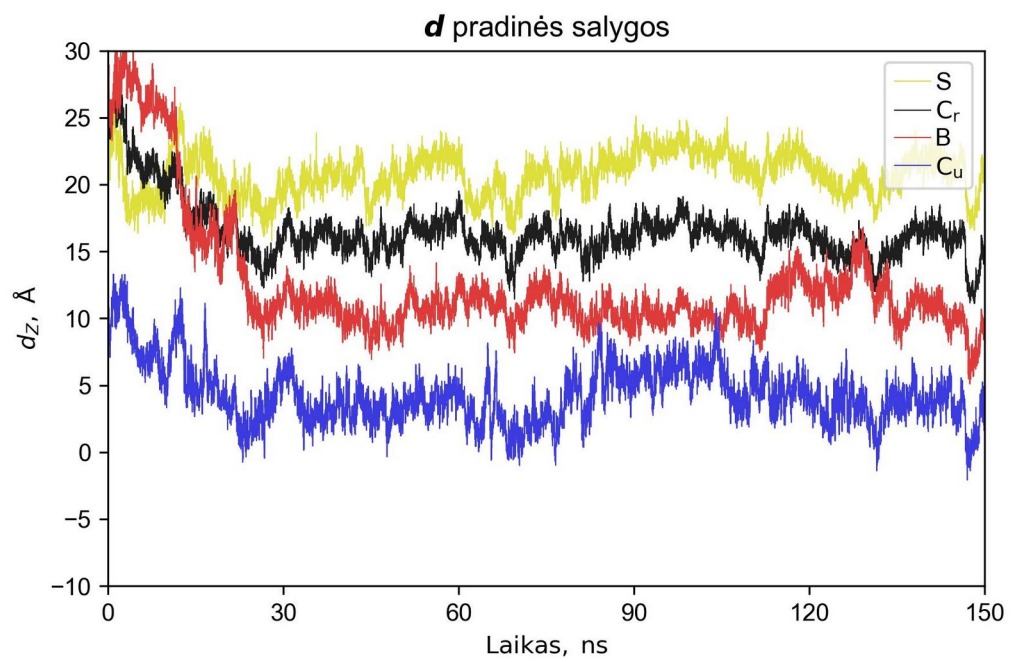


P8.2 pav.





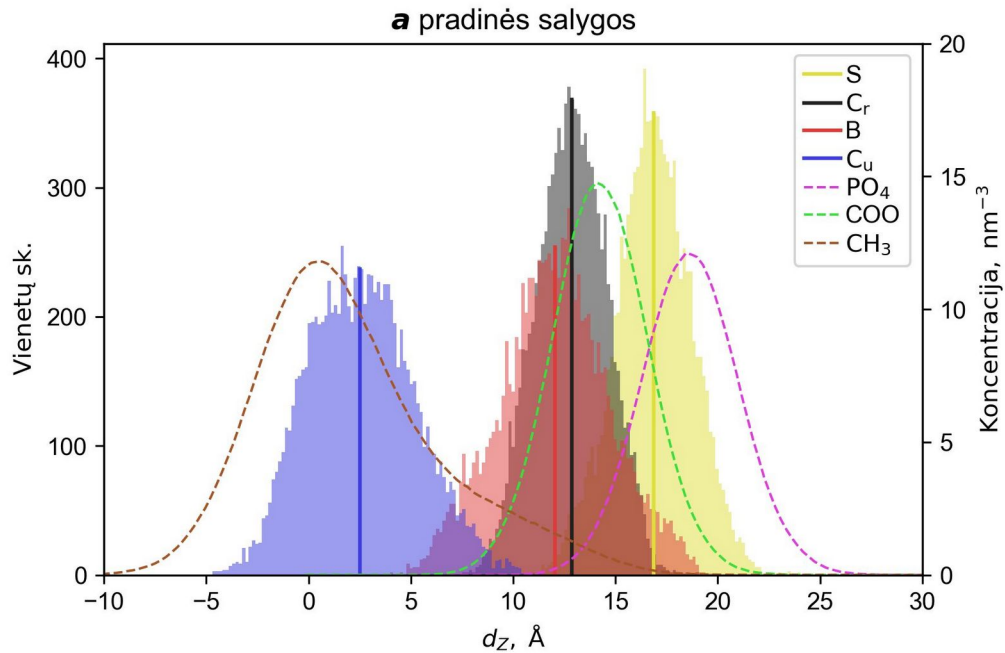
P8.3 pav.



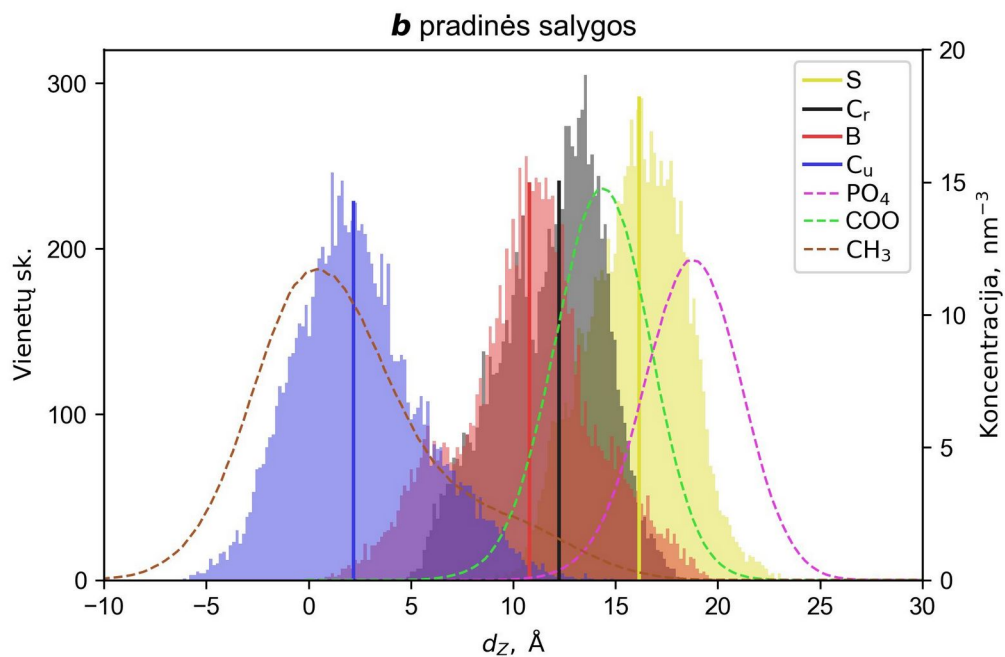
P8.4 pav.

## 9 Priedas

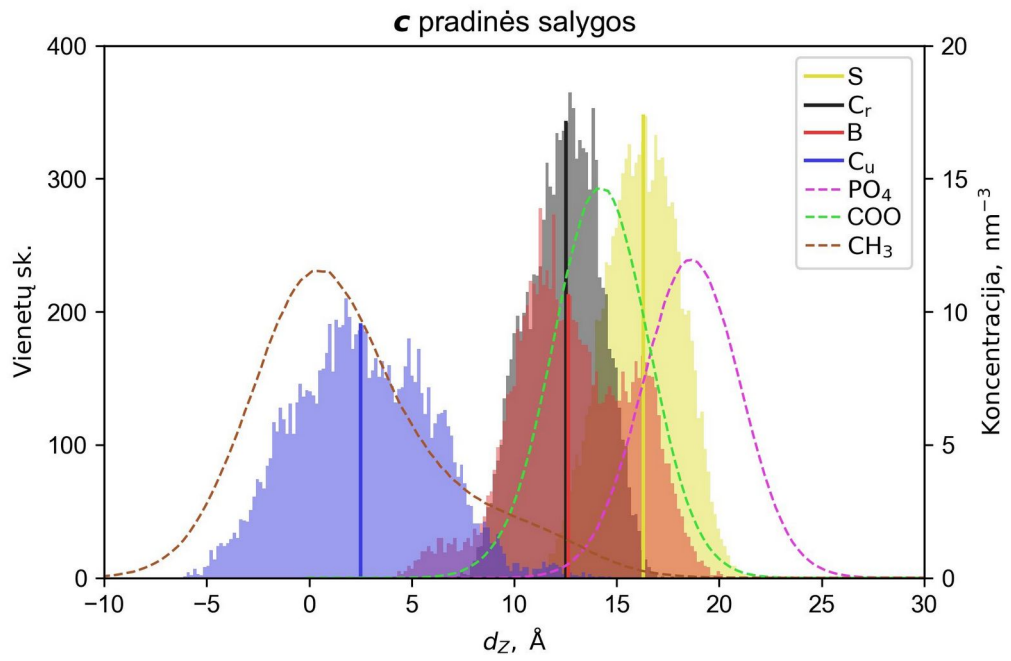
Paskutinių 100 ns simuliacijos  $L_d$  fazės *Lipid14* sistemos jutiklio atomų atstumo nuo membranos masės centro histograma, jų medianos (ištiesinė linija) bei membranos atomų skaičiaus tankio (koncentracijos) profiliai (brūkšninė linija). Skirtingi grafikai atitinka skirtingas pradines sąlygas.



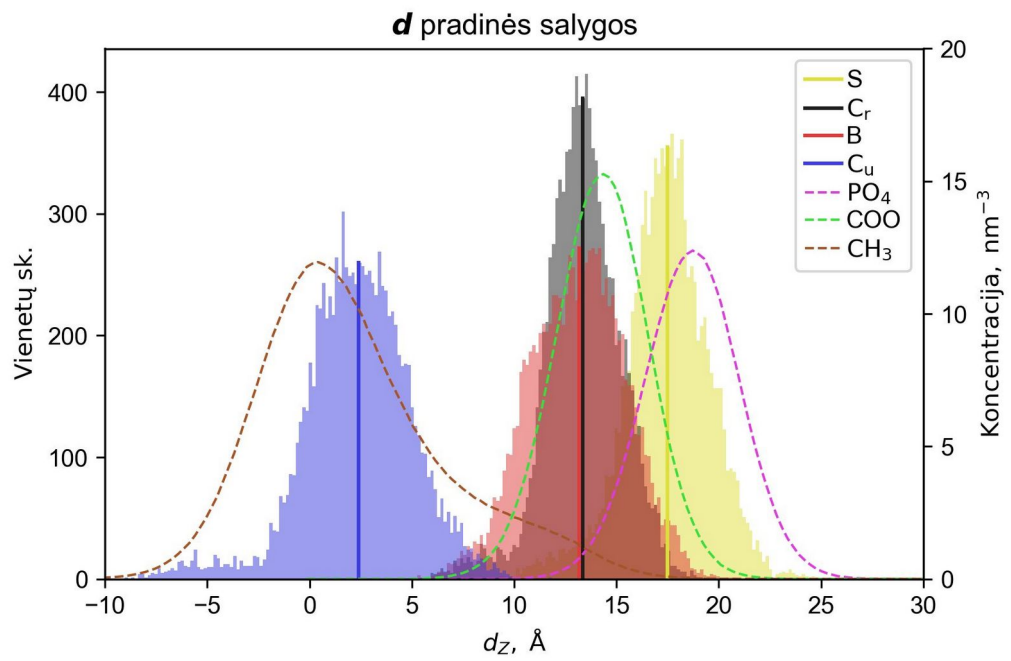
P9.1 pav.



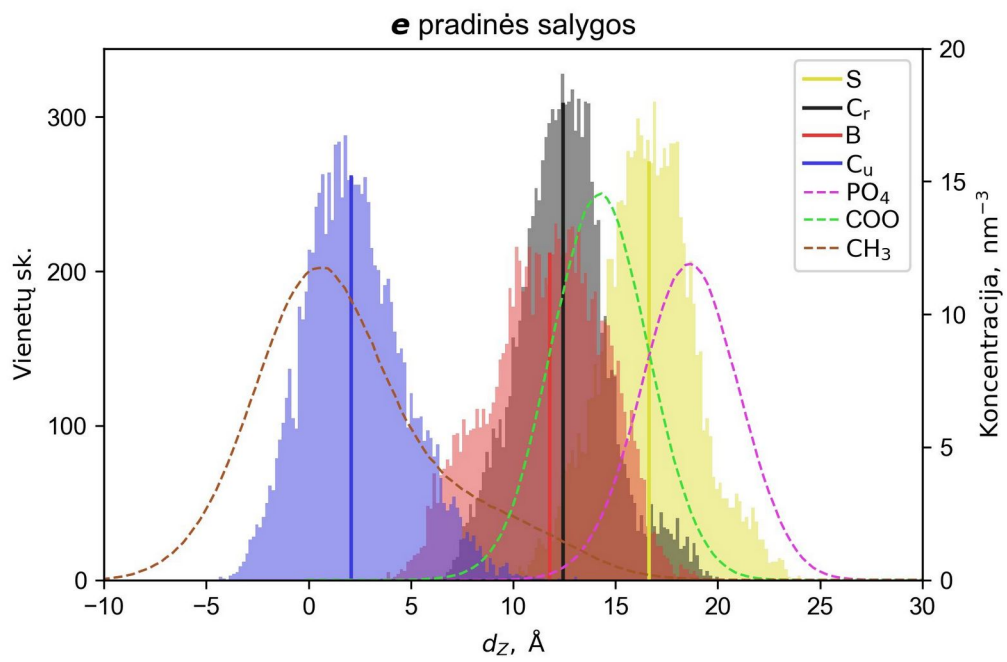
P9.2 pav.



P9.3 pav.



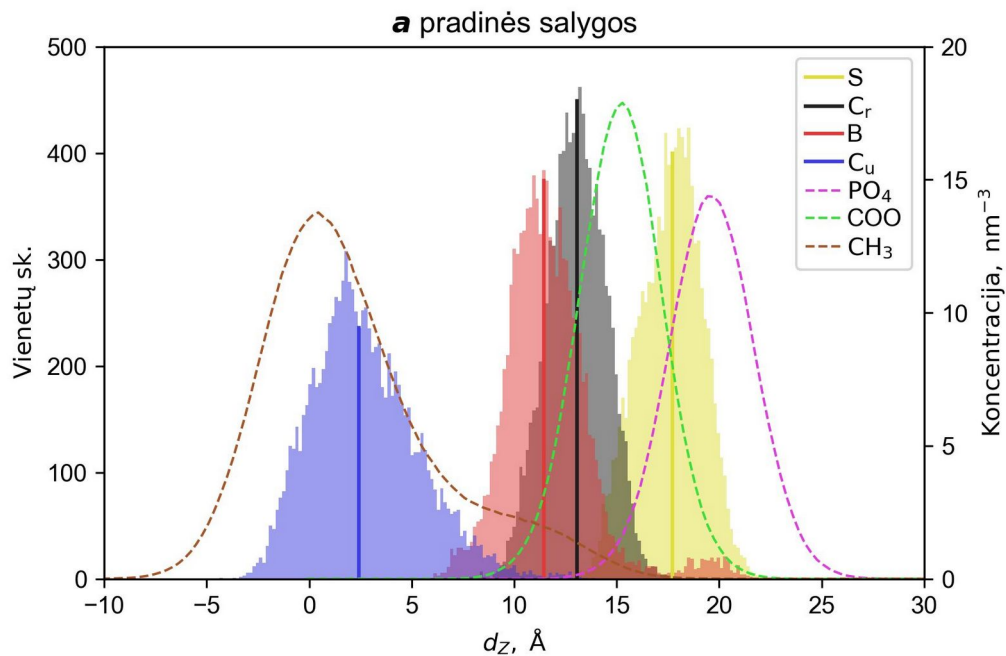
P9.4 pav.



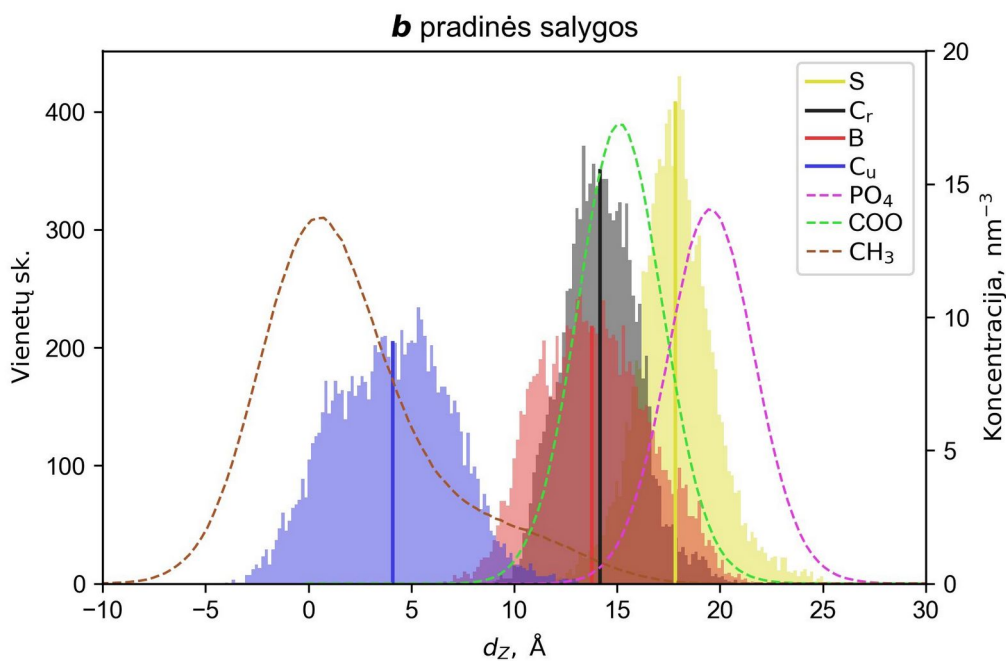
P9.5 pav.

## 10 Priedas

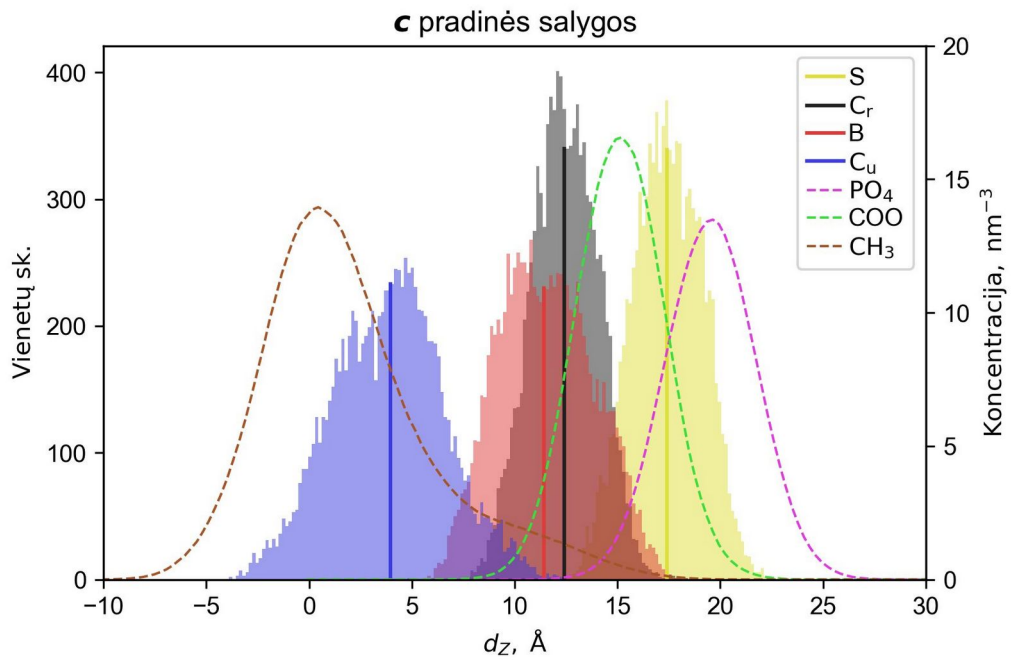
Paskutinių 100 ns simuliacijos  $L_d$  fazės *Lipid21* sistemos jutiklio atomų atstumo nuo membranos masės centro histograma, jų medianos (ištiesinė linija) bei membranos atomų skaičiaus tankio (koncentracijos) profiliai (brūkšninė linija). Skirtingi grafikai atitinka skirtingas pradines sąlygas.



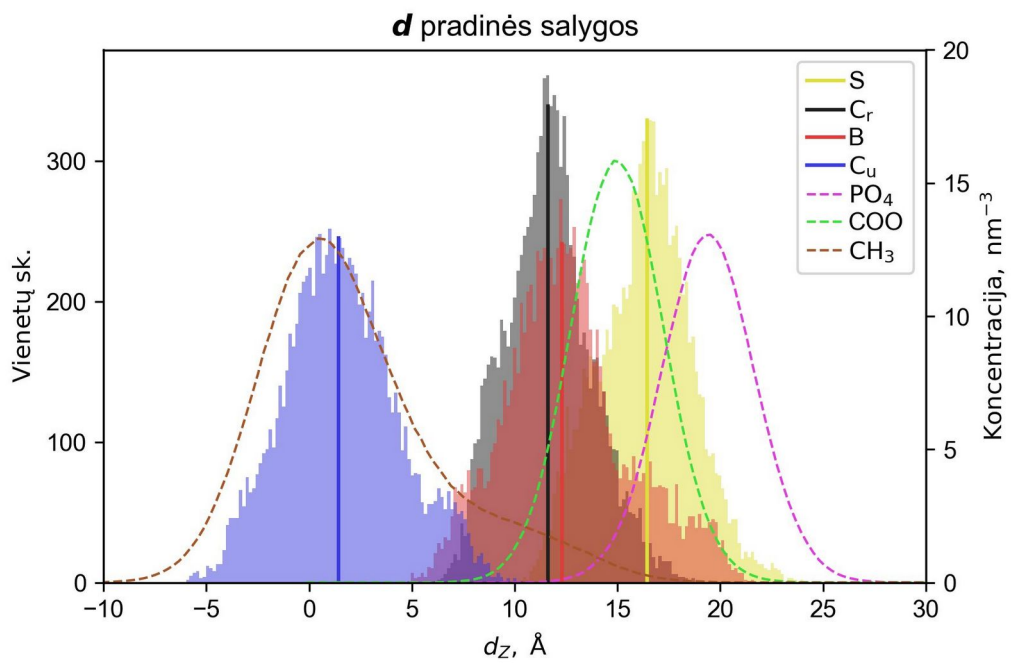
P10.1 pav.



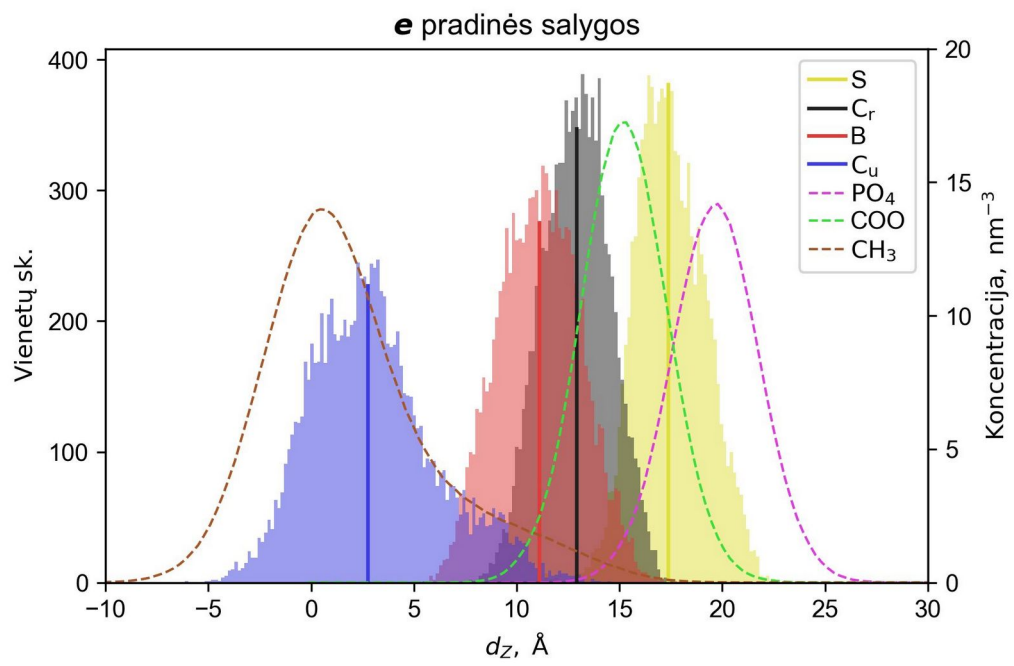
P10.2 pav.



P10.3 pav.



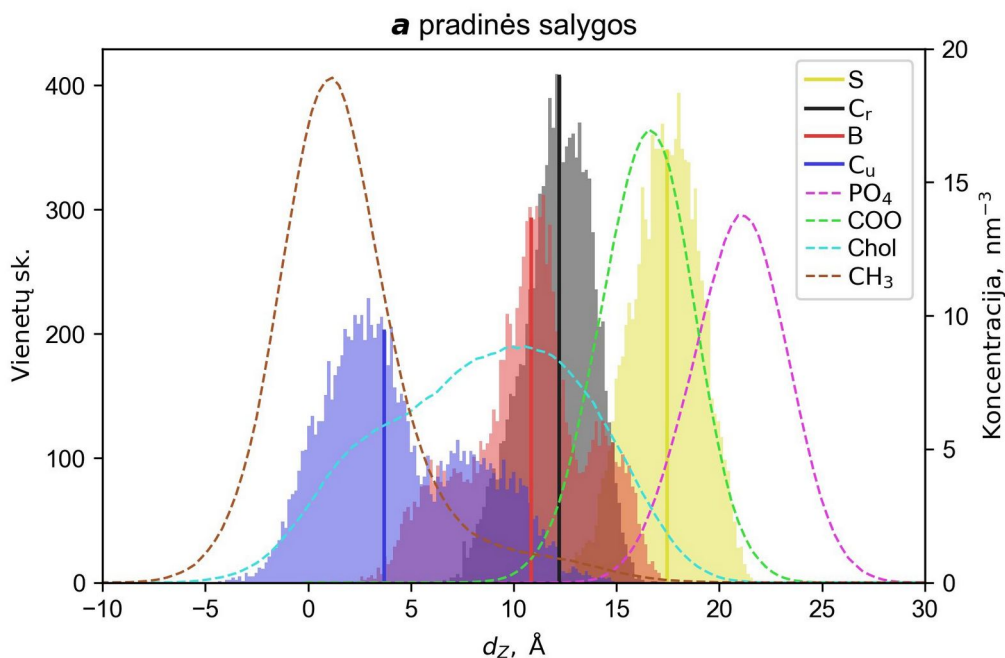
P10.4 pav.



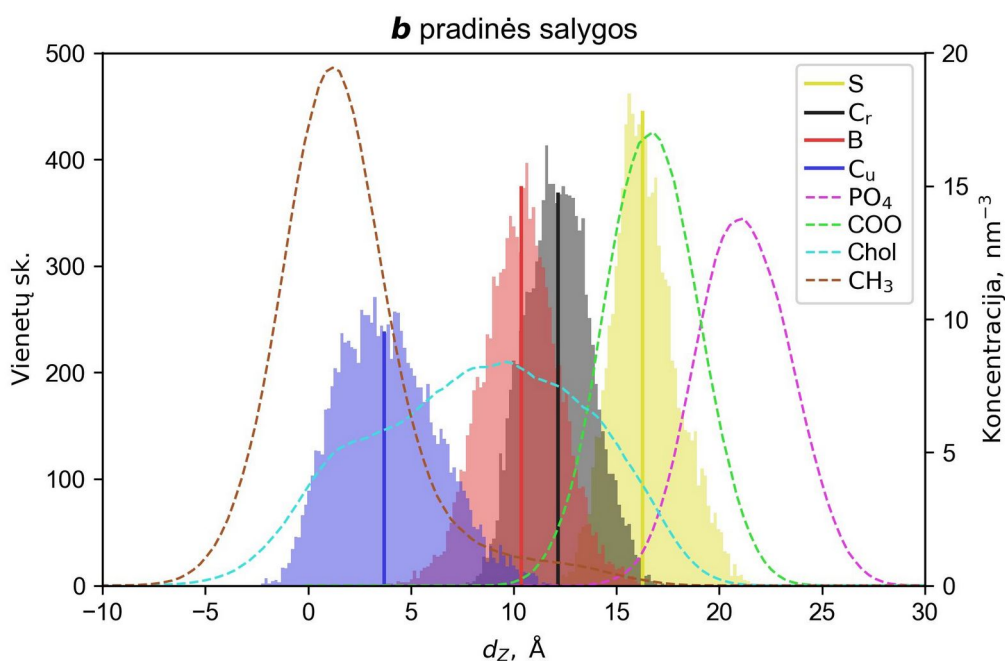
P10.5 pav.

# 11 Priedas

Paskutinių 100 ns simuliacijos  $L_o$  fazės *Lipid21* sistemos jutiklio atomų atstumo nuo membranos masės centro histograma, jų medianos (ištisinė linija) bei membranos atomų skaičiaus tankio (koncentracijos) profiliai (brūkšninė linija). Skirtingi grafikai atitinka skirtingas pradines sąlygas.

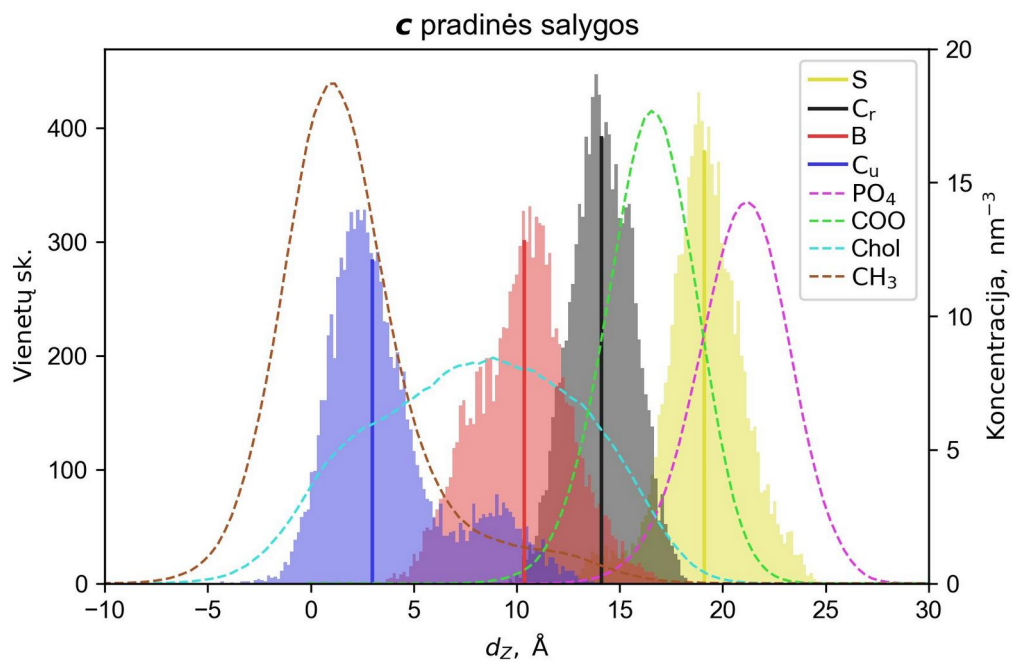


P11.1 pav.

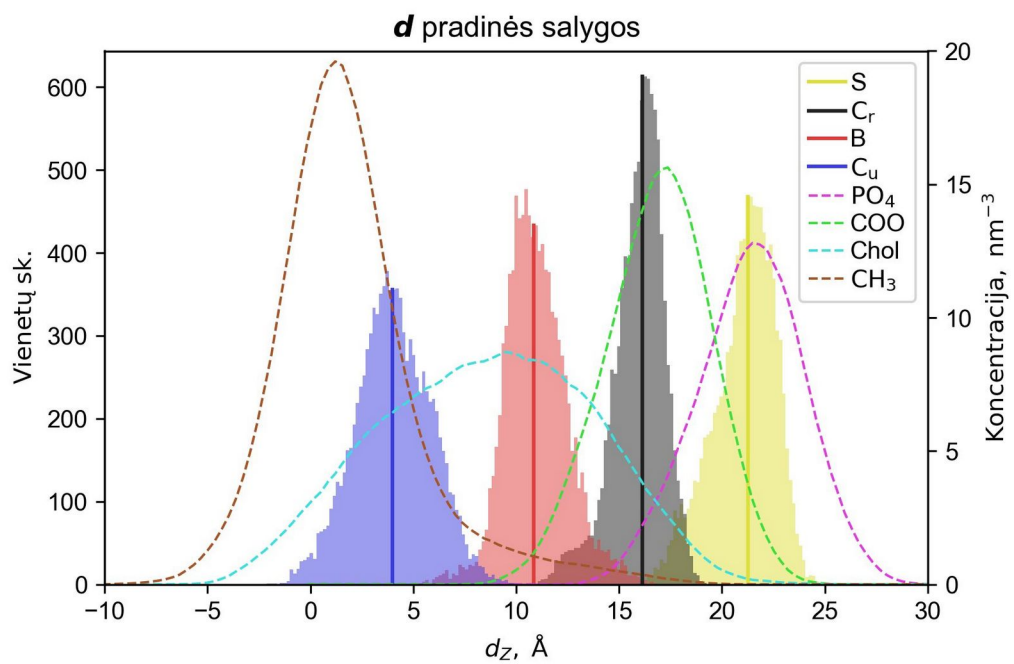


P11.2 pav.





P11.3 pav.



P11.4 pav.