



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO

HEIKKI MIKKOLAINEN

HDL-HIUKKASTEN RAKENNE JA ZETA-POTENTIAALI

Kandidaatintyö

Tarkastaja: Ilpo Vattulainen
Jätetty tarkastettavaksi: 12.5.2016

TIIVISTELMÄ

TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO

Teknis-luonnontieteellinen koulutusohjelma

Heikki Mikkolainen: HDL-hiukkasten rakenne ja zeta-potentiaali

Kandidaatintyö, 23 sivua

Toukokuu 2016

Pääaine: Teknillinen fysiikka

Tarkastajat: Professori Ilpo Vattulainen

Avainsanat: HDL, zeta-potentiaali, molekyylidynamiikka, kolesterolin, ateroskleroosi.

“Hyvänä kolesterolina” tunnetun HDL-hiukkasen (high density lipoprotein) ominaisuuksia tutkittiin laskennellisten molekyylidynamiikkasimulaatioiden avulla. Lipoproteiinit ovat rasva-aineista, eli lipideistä, ja proteiineista koostuvia hiukkasia, jotka kuljettavat kolesterolia ihmisen kehossa, ja ovat siten merkittäviä tekijöitä sydän- ja verisuonisairauksien synnyssä. HDL on lipoproteiineista tihein ja pienin. Se kuljettaa kolesterolia pois verisuonista, ja siten ehkäisee verisuonien tukkeutumista. Pienen koon takia HDL-hiukkasten kokeellinen tutkimus on haasteellista, ja esimerkiksi proteiinien rakennetta hiukkasen pinnalla ei täysin tunneta.

Eräs mielenkiintoinen ominaisuus on hiukkasen zeta-potentiaali. HDL-hiukkasen pinnalla olevat proteiinit ovat negatiivisesti varautuneita, joten HDL vaikuttaa sitä ympäröivien ionien jakaumaan. Se vetää vastaioneja puoleensa, jolloin niistä muodostuu sen pinnalle kerros, joka liikkuu hiukkasen mukana. Sähköstaattinen potentiaali tämän kerrostuman pinnalla voidaan kokeellisesti mitata, ja sitä kutsutaan zeta-potentiaaliksi.

Aiempien tutkimusten ja kirjallisuudesta saadun tiedon perusteella HDL-hiukkasesta rakennettiin kaksi hieman eri kokosta atomitaso tietokonemallia. Malleja tutkittiin molekyylihallinnusohjelmalla, ja niiden tärkeimmät ominaisuudet määritettiin. Tuloksia verrattiin muihin tutkimuksiin, ja mallien todettiin vastaavan todellisuutta suureksi osin melko hyvin. Zeta-potentiaali määritettiin eräessä toisessa tutkimuksessa kehitettyä menetelmää käyttäen, mutta tulokset eivät vastanneet kirjallisuudessa esiintyviä arvoja. Eron syytä pyrittiin selvittämään tarkastelemalla zeta-potentiaaliin vaikuttavia ilmiöitä, kuten polaaristen vesimolekyylien orientoitumista.

ALKUSANAT

Allekirjoittanut kiittää ohjauksesta Ilpo Vattulaista sekä Topi Karilaista, joka on periaatteessa toiminut tämän kandidaatintyön pohjana olevan projektin ohjaajana. Kiitokset zeta-potentiaalin laskemiseen käytettävästä koodista ja sen käytön opastuksesta kuuluvat Hector Martinez-Searalle. Kiitokset myös entisille ja nykyisille Batcaven tyypeille ym. kollegoille avusta, vinkeistä ja hyvästä seurasta.

Hervannassa, 12.5.2016

Heikki Mikkolainen

SISÄLLYS

1. Johdanto	1
2. HDL	2
2.1 Käänteinen kolesterolin kuljetus	3
2.2 Proteiinien konformaatio	3
2.3 Zeta-potentiaali	4
3. Menetelmät	5
3.1 Molekyyliidynamiikka	5
3.2 Analyysimenetelmät	6
3.2.1 HDL:n koko ja rakenne	6
3.2.2 Fosfolipidikerroksen ominaisuudet	7
3.2.3 Proteiinien konformaatio	8
3.2.4 Sähköstaattinen potentiaali	8
4. Systemit ja simulaatiot	10
4.1 Voimakenttä, algoritmit ja parametrit	11
5. Tulokset	13
5.1 HDL:n koko ja rakenne	13
5.2 Proteiinien konformaatio	15
5.3 Sähköstaattinen potentiaali	16
6. Yhteenveto	19
7. Lähteet	20

1. JOHDANTO

Lipoproteiinien on jo pitkään tiedetty olevan merkittävä tekijä sydän- ja verisuonitautien synnyssä. Lipoproteiineista tiheimmällä eli HDL:llä on huomattu olevan näiltä sairauksilta suojaava vaikutus. Tästä syystä HDL on saanut lempinimen “hyvä kolesterolit”. Vaikka lipoproteiineja on tutkittu jo vuosikausia, niiden rakenne ja toimintaperiaate on edelleen osittain epäselvä. Pieni koko ja monimutkainen koostumus lienevät suurimmat ongelmat etenkin HDL:n kokeellisessa tutkimuksessa.

Tässä kandidaatintyössä perehdytään HDL-hiukkasten ominaisuuksiin molekyyldynamiikkasimulaation avulla. Työssä on tehty HDL:sta atomistinen malli, jonka ominaisuuksia tutkitaan. Aiheesta on aiemmin tehty useita vastaavia tutkimuksia [36][24], mutta valtaosassa niistä on käytetty ns. karkeistettuja malleja. Kiekkomaisista HDL-hiukkasista on tehty myös atomistisia simulaatioita, mutta tässä työssä keskitytään nimenomaan pallomaisiin hiukkasiin. Erityisesti tässä työssä tutkitaan proteiinien konformaatiota HDL:n pinnalla ja HDL:n sähköstaattisia ominaisuuksia.

Kahden hieman erikokoisen HDL-hiukkasen ominaisuuksia verrataan toisiinsa, sekä muiden laskennallisten ja kokeellisten tutkimusten tuloksiin. Hiukkasten zeta-potentiaali määritetään käyttäen Heikkilän ym. artikkelissa [12] esiteltyä menetelmää. Lopuksi tutkitaan kuinka esimerkiksi vesimolekyylien orientoituminen vaikuttaa zeta-potentiaaliin.

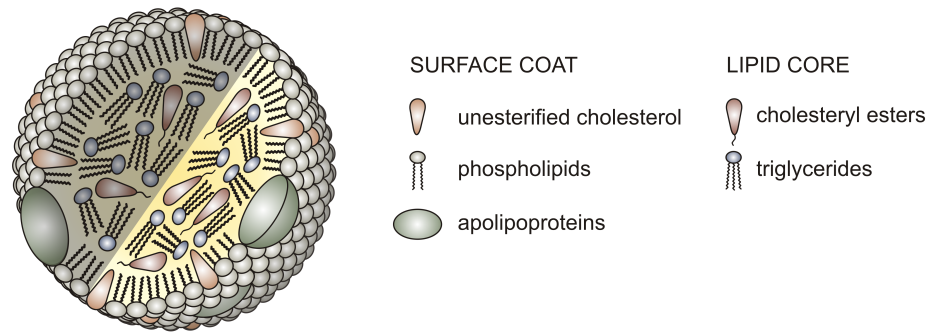
2. HDL

Ateroskleroosi eli valtimonrasvoittumistauti on edelleen eräs suurimmista kuoleman aiheuttajista länsimaissa. Merkittävimpiä riskitekijöitä ovat korkea verenpaine, diabetes, lihavuus, tupakointi ja veren korkea kolesterolipitoisuus [31]. Ateroskleroosissa valtimon sisäpinnalla olevan kalvon alle kerääntyy kolesterolia. Ajan myötä kolesterolikertymä, eli plakki, kasvaa niin suureksi, että se alkaa haitata veren virtausta. Plakki voi myös revetä, mikä aiheuttaa suonien tukkiutumisen.

Hyvin hydrofobisena molekyylinä kolesteroli ei sinällään liukene vereen, joten se kulkeutuu verisuonistossa lipoproteiineiksi kutsuttujen hiukkasten mukana [35]. Lipoproteiinit ovat lipideistä, eli rasva-aineista, ja proteiineista koostuvia kokonaisuuksia, jotka liukenevat veteen proteiinien polaarisuuden ansiosta. Lipoproteiinin rakenne on esitetty kuvassa 2.1. Hydrofobiset lipidit, kuten triglyseridit ja kolesteryylioleaatit, muodostavat lipoproteiinin ytimen. Hydrofobisen ytimen pinnalla on kerros amfipaattisista lipidejä, kuten fosfolipidejä, joissa hydrofiiliseen pääryhmään on liittynyt hydrofobisia hiiliketjuja. Lipideistä koostuvan rakkulan pinnalle on kiinnittynyt apolipoproteiineiksi kutsuttuja amfipaattisia proteiineja. Apolipoproteiinit jaetaan useampaan alaluokkaan, joista tärkeimmät ovat levymäinen apolipoproteiini B ja alfa-heliksinen apolipoproteiini A.

Lipoproteiinit voidaan jakaa tiheyden perusteella kolmeen luokkaan: HDL (high density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) ja VLDL (very low density lipoprotein). Apolipoproteiini A muodostaa HDL-hiukkasia ja apolipoproteiini B muodostaa LDL-hiukkasia. Useiden tutkimusten mukaan veren korkea HDL-pitoisuus madaltaa riskiä sairastua ateroskleroosiin, koska HDL kuljettaa kolesterolia verisuonistosta maksaan hävitettäväksi [31]. LDL tunnetaan yleisesti ”pahana kolesterolina”, sillä se edesauttaa ateroskleroosin syntymistä kuljettamalla kolesterolia valtimoihin.

HDL hiukkaset voidaan vielä tarkemmin erotella viiteen eri alaluokkaan. Nämä luokat ovat tiheimmästä alkaen lueteltuna HDL_{3c}, HDL_{3b}, HDL_{3a}, HDL_{2a} ja HDL_{2b}. Tiheyden lisäksi eri alaluokkiin kuuluvat HDL-hiukkaset eroavat toisistaan lipidi- ja proteiini-koostumukseltaan. [4][11]



Kuva 2.1: Lipoproteiinin rakenne [2].

2.1 Käänteinen kolesterolin kuljetus

Maksa tuottaa apoA-I -apolipoproteiinia, joka on HDL-hiukkasien tärkein proteiini- ja lipidi-osa. ApoA-I vapautuu veriplasmaan jossa se muodostaa fosfolipidien kanssa nuoria HDL hiukkasia. Fosfolipidit pyrkivät amfipaattisen luonteensa takia muodostamaan kaksoiskalvon, jossa kalvojen hydrofobiset puolet ovat vastakkain. ApoA-I kietoutuu kaksoiskalvorakenteen ympärille, ja näin muodostuu kiekkomainen rakenne. Nämä hiukkaset keräävät kolesterolia verisuonien seinämiin kerääntyneestä plakista.

LCAT-entsyymi (Lecithin—cholesterol acyltransferase) muuttaa kolesterolin kolesteryyliesteriksi. Kolesteryyliesterit ovat hyvin hydrofobisia molekyylejä, joten ne pyrkivät kaksoiskalvorakenteen sisään. Tällöin HDL-hiukkanen paisuu, ja kiekkomainen rakenne muuttuu pallomaiseksi. HDL kuljettaa kolesteroliesterin maksaan, jossa se liittyy SRB1-reseptoriin (scavenger receptor class B member 1) ja vapauttaa lastin. HDL voi myös siirtää kolesteryyliestereitä muihin lipoproteiineihin CETP-proteiinin (cholesteryl ester transfer protein) välityksellä. [23]

2.2 Proteiinien konformaatio

ApoA-I on 243 aminohapon pituinen varauksellinen apolipoproteiini, jossa varsinkin aminohapot 44-243 ovat sekundaarirakenteeltaan pääasiassa alfa-heliksiä [27]. Pallomaisessa HDL-hiukkasessa noin 76-80 prosenttia apoA-I -proteiinista on alfa-heliksiä [17]. Heliksi on hyvin amfipaattinen, eli heliksin toisella puolella on enimmäkseen hydrofobisia aminohappoja, kun taas toinen puoli koostuu lähinnä polaarista aminohapoista [28]. Kiekkomaiset HDL-hiukkaset koostuvat noin 160 lipidistä, ja useimmiten kahdesta apolipoproteiinista. Kahden proteiinin välisten sidosten perusteella proteiinit todennäköisesti muodostavat lipidien ympärille ”kaksoisvyön” siten että ne asettuvat vierekkäin vastakkaisuuntaisesti. [27]

Pallomaisissa HDL-hiukkasissa on kolmesta viiteen apolipoproteiinia, mutta tutkimusten mukaan niiden väliset kontaktit ovat silti vastaavanlaisia kuin kiekkomaisen HDL:n

kaksoisvyömallissa. Tämän voisi selittää rakenne, jossa toinen puoli kaksoisvyöstä purkautuu ja proteiinit erkanevat toisistaan. Siten proteiinit voivat muodostaa sidoksia muiden apolipoproteiinien kanssa. Näin muodostuu häkkimäinen rakenne, jossa kaikilla proteiineilla voi niiden lukumäärästä riippumatta olla samankaltaiset sidokset toisiin proteiineihin. [28] Mikäli apolipoproteiinit muodostaisivat tällaisen rakenteen täysin suoritettuina, olisi niiden muodostaman “häkin” arvioitu halkaisija suurempi kuin HDL-hiukkasen halkaisija. Häkin voidaan kuitenkin olettaa vääntyvän tai kiertyvän siten että sen koko täsmää HDL:n kokoon. [17]

2.3 Zeta-potentiaali

Varaukselliset hiukkaset, kuten HDL, vaikuttavat ionien jakaumaan hiukkasen ympärillä. Vastaionien konsentraatio kasvaa pinnan läheisyydessä, ja ympäröivästä nesteestä muodostuu kaksoiskerros. Sisempi kerros on Stern-kerros, jossa ionit ovat sitoutuneet tiukasti kiinni hiukkaseen. Ulommassa kerroksessa ionit ovat sitoutuneet hiukkaseen löyhemmin ja voivat liikkua vapaammin, mutta kulkeutuvat kuitenkin hiukkasen mukana. Näiden kerrosten rajapintaa kutsutaan Stern-pinnaksi. Uloimman kerroksen ulkopintaa taas kutsutaan liukupinnaksi (engl. slipping plane), ja sähköstaattinen potentiaali tällä pinnalla on zeta-potentiaali. Zeta-potentiaalin suuruus kertoo hiukkasten taipumuksesta kerääntyä rykelmiksi. Jos zeta-potentiaali on hyvin positiivinen (tai hyvin negatiivinen), hiukkaset hylkivät toisiaan, eikä rykelmiä muodostu. Yleisesti ottaen zeta-potentiaalin ollessa yli +30 mV tai alle -30 mV, voidaan seosta pitää stabiilina.

Kokeellisesti zeta-potentiaali voidaan määrittää esimerkiksi tutkimalla hiukkasten elektroforeettista liikkuvuutta. Kokeellisen menetelmin tehdyn tutkimuksen mukaan HDL:n zeta-potentiaali olisi $-12,4 \pm 0.1$ mV [38]. Toisen lähteen mukaan HDL:n pintapotentiaali (engl. surface potential), eli potentiaali hiukkasen todellisella pinnalla, olisi -11,0 mV (HDL₂) tai -11,5 mV (HDL₃) [29].

3. MENETELMÄT

Kaikki työssä tehty tutkimus on tehty laskennallisista menetelmistä. Simulaatioiden laskemiseen sekä niiden analysointiin käytettiin GROMACS-ohjelmistoa. Käytössä oli ohjelmiston versio 4.6. Laskuja suoritettiin sekä Tieteen tietotekniikan keskuksen (CSC) että Tampereen teknillisen yliopiston omilla supertietokoneilla. Simuloitujen systeemien visualisointiin käytettiin VMD-ohjelmaa [18]. Laskennallisesti raskaita analyysejä nopeutettiin rinnakkaistamalla ajoja GNU Parallel -ohjelmalla [30]. Tulosten käsittelyä varten kirjoitetuissa skripteissä hyödynnettiin NumPy-pakettia [32].

3.1 Molekyylidynamiikka

Molekyylidynamiikka (MD) on tietokonesimulaatiomenetelmä, jolla monimutkaisia systeemejä voidaan mallintaa atomitasolla. Molekyylidynamiikassa ratkaistaan numeerisesti Newtonin liikeyhtälöt kullekin systeemin atomille, jolloin voidaan seurata systeemin evoluutiota ajan kuluessa.

Klassisessa molekyylidynamiikassa atomien välisiä vuorovaikutuksia kuvaa potentiaalfunktio, joka on yleensä muotoa

$$\begin{aligned}
 U(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = & \sum_{\text{sidokset}} \frac{a_i}{2} (l_i - l_{i0})^2 \\
 & + \sum_{\text{kulmat}} \frac{b_i}{2} (\theta_i - \theta_{i0})^2 \\
 & + \sum_{\text{torsio}} \frac{c_i}{2} [1 + \cos(n\omega_i - \gamma_i)] \\
 & + \sum_{\text{atomiparit}} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \\
 & + \sum_{\text{atomiparit}} k \frac{q_i q_j}{r_{ij}}.
 \end{aligned} \tag{3.1}$$

Kolme ensimmäistä termiä ovat molekyylin sisäisiä vuorovaikutuksia. Atomien välisten kovalenttisten sidosten venymistä ja taipumista kuvataan siis harmonisina potentiaaleina. Neljäs termi kuvaa atomien välisiä repulsiivisia ja attraktiivisia dispersiovuorovaikutuksia Lennard-Jones -mallin mukaisesti. Viides termi kuvaa atomien välisiä sähköstaattisia vuorovaikutuksia. [1] Potentiaalfunktiossa esiintyvät vakiot saadaan käytetystä voimakentästä, joita on kehitetty erilaisia. Tässä työssä on käytetty OPLS (Optimized Potentials

for Liquid Simulations) voimakenttää.

Potentiaalfunktiosta saadaan laskettua atomeihin vaikuttavat voimat systeemin tilan perusteella

$$\mathbf{F}_i = -\nabla_{\mathbf{r}_i} U(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N). \quad (3.2)$$

Kun atomiin vaikuttavat voimat tunnetaan, voidaan laskea sen kiihtyvyys, mistä taas voidaan laskea sen nopeus. Kun nopeus tunnetaan, voidaan laskea, mikä on atomin sijainti lyhyen aika-askeleen δt kuluttua

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i(t)\delta t. \quad (3.3)$$

Aika-askeleen kuluttua atomien sijainnit ovat muuttuneet hieman, joten myös atomeihin vaikuttavat voimat ovat muuttuneet. Voimat lasketaan uudelleen, ja taas määritetään atomien sijainnit pienen aika-askeleen kuluttua. Tätä algoritmia toistamalla saadaan laskettua atomien liikeradat systeemissä.

3.2 Analyysimenetelmät

Simulaatioista saadun datan analysointia varten tulee GROMACS-ohjelmiston mukana useita valmiita analyysiohjelmia. Tärkein simulaatiosta tallennettava tieto on atomien koordinaatit simulaation aikana. Tämän tiedon perusteella voidaan jo päätellä tai laskea monia asioita, kuten esimerkiksi tutkittavien kappaleiden koko.

3.2.1 HDL:n koko ja rakenne

HDL:n rakennetta voidaan tutkia radiaalisen jakauman (engl. radial distribution function, RDF) avulla. Radiaalinen jakaumafunktio $g(r)$ kertoo suhteellisen todennäköisyyden löytää hiukkanen etäisyydellä r määrätystä pisteestä, tässä tapauksessa HDL:n keskipisteestä. RDF määritellään seuraavasti:

$$g(r) = \frac{\langle \rho(r) \rangle}{\langle \rho \rangle_{lokaali}}, \quad (3.4)$$

jossa $\langle \rho(r) \rangle$ on hiukkasten tiheys etäisyydellä r ja $\langle \rho \rangle_{lokaali}$ on hiukkasten keskimääräinen tiheys kaikilla etäisyyksillä. [6] RDF:n laskemiseen käytettiin GROMACS-paketin `g_rdf`-ohjelmaa, joka jakaa tutkittavan systeemin dr :n paksuisiin pallokuoriin ja laskee näiden hiukkastiheydet. Samalla tulee laskettua myös normalisoimaton radiaalinen tiheys etäisyyden r funktiona. Laskemiseen käytetään tiheyksien keskiarvoa mahdollisimman pitkältä aikaväliltä.

Gyraatiosäde on neliöllinen keskiarvo kappaleen osien etäisyyksistä massakeskipisteestä. Sitä käytetään usein proteiinien kompaktiuden mittana. GROMACS:n työkalu `g_`

gyrate laskee gyraatiosäteen R_g seuraavasti:

$$R_g = \left(\frac{\sum_i ||\mathbf{r}_i||^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{1/2}, \quad (3.5)$$

jossa m_i on atomin i massa ja $\mathbf{r}_i$ on atomin sijainti suhteessa koko molekyylin massa-keskipisteeseen. [6] Gyraatiosäteen avulla on helppo vertailla hiukkasia toisiinsa, mutta se ei ole erityisen hyvä suure kuvaamaan hiukkasen todellista kokoa, joten käytetään jotain järkevämpää tapaa arvioida hiukkasen koon arviointiin. Määritetään hiukkasen säde tutkimalla HDL:n atomien radiaalista tiheyttä suhteessa vesimolekyylien radiaaliseen tiheyteen systeemissä. Hiukkasen säde olkoon etäisyys, jota kauempana veden atomitiheys on suurempi kuin HDL:n atomitiheys.

3.2.2 Fosfolipidikerroksen ominaisuudet

Lipidien järjestysparametri (engl. order parameter) on lipidikalvon järjestyneisyyttä kuvaava suure, joka voidaan kokeellisesti määrittää NMR-mittausten avulla. Järjestysparametri lipidin hiiliketjun hiilelle on määritelty seuraavasti:

$$S_{CD} = \left\langle \frac{3 \cos^2 \Theta - 1}{2} \right\rangle, \quad (3.6)$$

missä Θ on hiili-vety -sidoksen ja lipidikalvon normaalin välinen kulma. [34] Kulmasulut tarkoittavat tässä keskiarvoa ajan suhteen. Simulaatioista järjestysparametri voidaan määrittää g_order -ohjelmalla, joka pystyy huomioimaan myös lipidikalvon kaarevuuden.

Fosfolipikalvon paksuus voidaan määrittää fosfolipidin pääryhmän ja hiiliketjun pään välisenä etäisyytenä. Pääryhmän fosforiatomin keskimääräinen etäisyys HDL:n keskipisteestä määritetään g_rdf -ohjelmalla lasketusta jakaumasta integroimalla. Vastaavasti määritetään fosfolipidin sn1-hiiliketjun viimeisen hiiliatomin keskimääräinen etäisyys. Näiden erotuksesta saadaan arvio fosfolipidikalvon paksuudesta.

Lipidipääryhmäkohtaisen pinta-alan (engl. area per lipid headgroup) määrittäminen HDL:n kaltaiselle kappaleelle on haasteellinen tehtävä. HDL:n pinta on hyvin rosainen ja epäsymmetrinen, joten on hankala määrittää kappaleelle säde jonka mukaan pinta-ala lasketaan. Lisäksi pienen koon takia pienikin virhe voi muuttaa tulosta merkittävästi. Tässä työssä säteeksi R valitaan fosfolipidien pääryhmän fosforiatomin keskimääräinen etäisyys HDL:n keskipisteestä. Osa kappaleen pinnasta proteiinien peitossa, mikä täytyy ottaa huomioon. Fosfolipidien osuus kappaleen pinnasta arvioidaan atomitiheyksien perusteella. Jos fosfolipidiatomien tiheys etäisyydellä r HDL:n keskipisteestä on $\rho_{POPC}(r)$ ja proteiiniatomien tiheys vastaavasti $\rho_{Proteiini}(r)$, voidaan lipidipääryhmäkohtainen pinta-ala A

laskea kaavalla

$$A = \frac{R^2}{N} \times \frac{\rho_{\text{POPC}}(R)}{\rho_{\text{Proteiini}}(R)}, \quad (3.7)$$

missä N on lipidien määrä kalvossa.

SASA (Solvent accessible surface area), eli liuottimen saavutettavissa oleva pinta-ala, on kappaleen pinta-ala, joka on sitä ympäröivän liuottimen saavutettavissa. SASA määritetään vierittämällä pallon muotoista testikappaletta molekyylin van der Waals -pintaa pitkin. Reitti, jota pitkin pallon keskipiste kulkee, määrää SASA:n. [9] Laskemalla SASA kullekin hiukkasen komponentille, voidaan määrittää niiden osuus hiukkasen pinnasta. SASA:n laskemiseen käytettiin GROMACS-paketin `g_sas`-ohjelmaa. Testikappaleen säteenä käytettiin ohjelman oletusarvoa, joka on 0,14 nm.

3.2.3 Proteiinien konformaatio

Proteiinien sekundaarirakenteen tutkimiseen käytettiin DSSP-algoritmia. DSSP tunnistaa atomien koordinaattien perusteella proteiinin selkärangan vetysidokset ja päättelee niiden perusteella proteiinin sekundaarirakenteen [19][20]. Mahdollisia rakenteita ovat erilaiset kierteet eli heliksit (3_{10} -heliksi, α -heliksi ja π -heliksi), levyt eli laskokset (β -laskos), käännökset ja mutkat. GROMACS:n työkalu `do_dssp` mahdollistaa DSSP-algoritmin käytön GROMACS:n tiedostoformaattien kanssa, ja sekundaarirakenteen muutoksia voidaan tarkkailla simulaation aikana.

3.2.4 Sähköstaattinen potentiaali

Sähköstaattinen potentiaali ϕ etäisyydellä r lasketaan kaavalla

$$\phi(r) = \int_0^r \mathbf{E}(r') dr', \quad (3.8)$$

missä $\mathbf{E}$ on sähkökenttä:

$$\mathbf{E}(r) = \frac{Q_r}{4\pi\epsilon_0 r^2}. \quad (3.9)$$

Q_r on r -säteisen pallon sisälleen sulkema varaus ja ϵ_0 on tyhjiön permittiivisyys. Simulaatiossa jokaisella atomilla on vakiona pysyvä varaus/osittaisvaraus, joten Q_r saadaan laskettua suoraan summaamalla kaikkien säteen r sisällä olevien atomien varaukset. Sähköstaattinen potentiaali sekä varaus Q_r lasketaan `g_H_potential`-ohjelmalla, joka on kehitetty GROMACS:n mukana toimitettavan `g_potential`-ohjelman pohjalta. Ero alkupe-
räiseen ohjelmaan on mahdollisuus laskea potentiaali radiaalisesti tutkittavan kappaleen ympärillä. Parhaaseen tulokseen näyttäisi pääsevän laskemalla potentiaalin 0,001 nm vä-

lein, joten tätä arvoa käytettiin laskuissa. Zeta-potentiaalin laskemiseen tarvitaan myös liukupinnan sijainti, jonka määrittäminen onnistuu ionien radiaalista jakaumaa tarkastelemalla. Debye-Hückel -teorian (DH) mukaan vapaasti liikkuvien ionien jakauma hiukkasen ympärillä noudattaa kaavaa

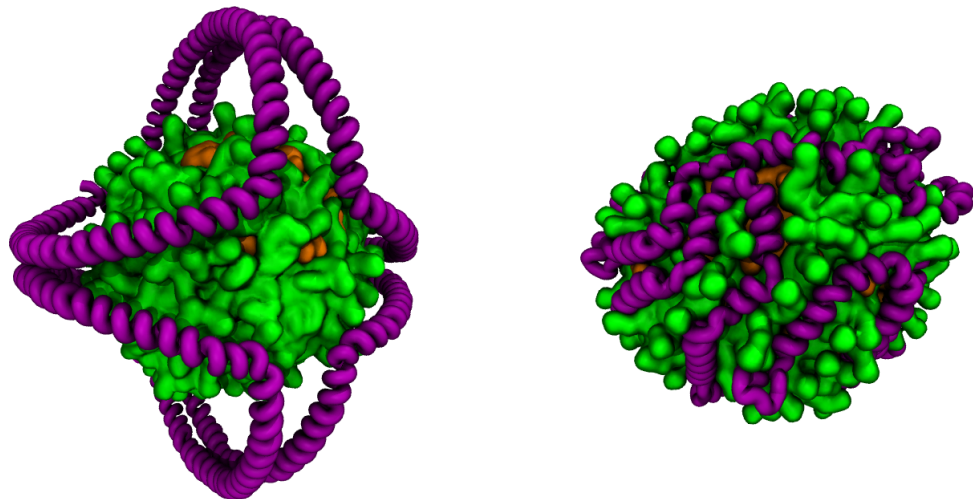
$$\frac{1}{r}Ae^{-Br} + C, \quad (3.10)$$

missä A , B ja C ovat vakioita. Kun DH-käyrä sovitetaan vastaionien radiaalisen jakauksen, voidaan liukupinnan arvioida olevan käyrien erkanemiskohdassa, ja zeta-potentiaali on tällöin sähköstaattinen potentiaali tässä kohdassa. [12]

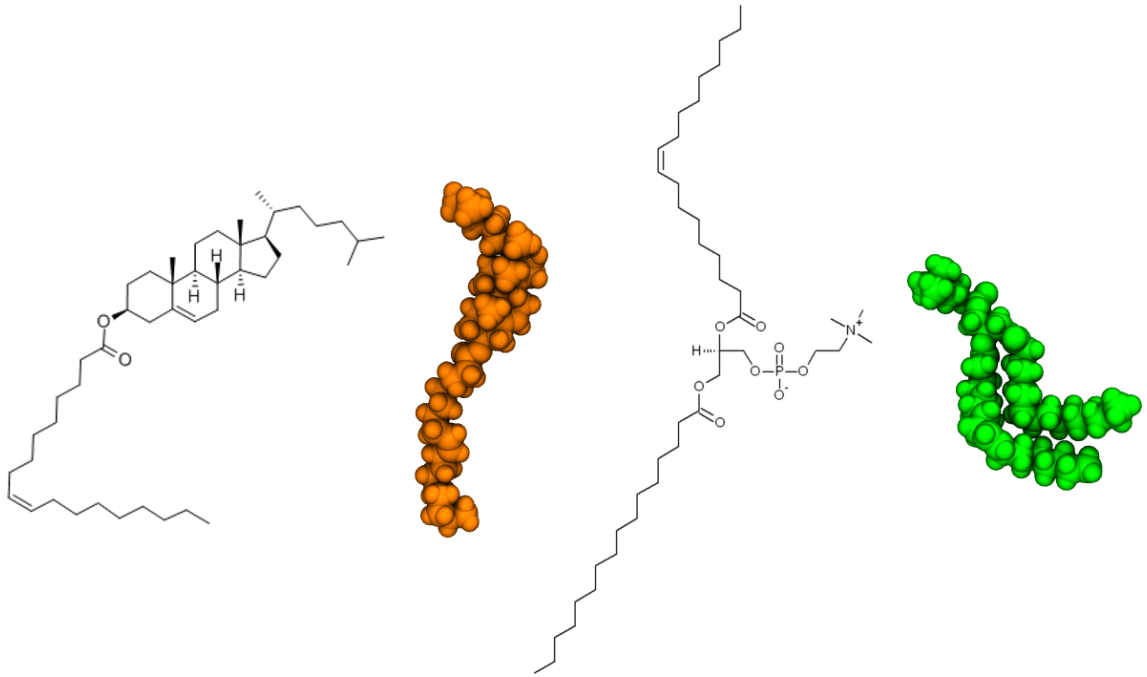
Vesimolekyylien orientoitumista HDL:n ympärillä tutkittiin GROMACS:n `g_sorient`-ohjelmalla. Ohjelma määrittää kullekin vesimolekyyliä happiatomista vetyatomien keskipisteeseen osoittavan vektorin. Tämän vektorin ja HDL-hiukkasen normaalin välinen kulma θ lasketaan jokaiselle vesimolekyyliä. Eri etäisyyksillä HDL:n keskipisteestä sijaitseville vesimolekyyliä lasketaan θ -kulman keskiarvo.

4. SYSTEEMIT JA SIMULAATIOT

HDL:n malli päätettiin rakentaa kolesteryylioleaatista, POPC-fosfolipidistä ja apoA-I -apolipoproteiinista. 106 kolesteryylioleaatista (CO) rakennettiin lipidirakkulan ydin, jonka pinnalle asetettiin 133 POPC-molekyyliä. Neljä apolipoproteiinia laitettiin löyhästi rakkulan ympärille kuvan 4.1 mukaisesti. Lipidien rakenteet on esitetty kuvassa 4.2. Tällä koostumuksella arvioitiin saatavan ominaisuuksiltaan todellista HDL-hiukkasta vastaava malli, joka kuitenkin ei ole liian monimutkainen simuloinnin ja analysoinnin kannalta. HDL:n malli asetettiin simulaatiolaatikkoon, jonka sivun pituudeksi määritettiin 13,5 nanometriä, minkä ajateltiin olevan riittävän suuri jotta periodisten reunaehdot eivät aiheuttaisi ongelmia. Laatikkoon lisättiin natrium-ioneja neutraloimaan proteiinien negatiivinen varaus. Systeemiä simuloitiin 5 nanosekuntia tyhjiössä, jolloin proteiini asettui nopeasti lipidirakkulan pinnalle. Simulaatiolaatikkoon lisättiin sattumanvaraisesti sijainteihin vesimolekyyliä siten että laatikko täyttyi. Osa vesimolekyyleistä korvattiin Cl^- ja Na^+ -ioneilla, jotta veden ionikonsentraatio saatiin vastaamaan veren suolakonsentraatiota, joka on noin 150 mmol/l.



Kuva 4.1: Ison HDL:n rakenne simulaation alussa ja lopussa. Vasemmanpuoleisessa kuvassa proteiinit (violetti) ovat aseteltuna lipidirakkulan ympärille. Fosfolipidit (vihreä) peittävät lähes koko lipidirakkulan, mutta myös kolesteryylioleaattia (oranssi) on joissain kohdissa hieman näkyvissä. Oikeanpuoleisessa kuvassa nähdään simulaation lopputulos. Proteiinit ovat asettuneet kiinni lipidirakkulan pintaan, ja alfa-heliksit ovat osittain purkautuneet. Graafinen esitys systeemistä tehtiin VMD-ohjelmistolla [18].



Kuva 4.2: Simulaatioissa käytetyt lipidit: kolesteryylioleaatti (CO) ja 1-palmitoyyli-2-oleoyyli-sn-glysero-3-fosfokoliini (POPC). Kolesteryylioleaatin neljästä hiilirenkaasta koostuvan rungon molemmissa päissä on hiiliketjut, joten molekyyli on hyvin hydrofobinen. POPC koostuu hydrofiilisesta pääryhmästä ja kahdesta pitkästä hydrofobisesta hiiliketjusta. Rakennekaavat: [5] ja [8].

Rakennetta tasapainotettiin ensin vakiotilavuudessa (NVT) 100 pikosekuntia ja sitten vakiopainossa (NPT) toiset 100 pikosekuntia. Tämän jälkeen aloitettiin 500 nanosekuntia pitkä tuotantosimulaatio. Tässä vaiheessa huomattiin sähköstaattisen potentiaalin laskeminen vaativan suuremman simulaatiolaatikon, joten systeemiin lisättiin vesimolekyyliä ja ioneja siten että laatikon kooksi saatiin 18 nanometriä. Simulaatiota jatkettiin suuremmassa laatikossa vielä 200 nanosekuntia. Koska tähän saakka tehdyillä simulaatioilla ei saavutettu sähköstaattisen profiilin osalta haluttuja tuloksia, päivitettiin lipidien voimakenttäparametrit uudempaan versioon. Simulaatiota jatkettiin simulaatioita päivitetyllä voimakentällä 1600 nanosekuntia.

Vertailun vuoksi rakennettiin toinen pienempi systeemi poistamalla 20 kolesteryylioleaattia hiukkasen ytimestä. Resurssien säästämiseksi rakenteen pohjana käytettiin alkupe-
räistä isompaa systeemiä, jota oli jo simuloitu päivitetyllä voimakentällä muutamia kymmeniä nanosekunteja. Tätäkin systeemiä simuloitiin noin 1600 nanosekuntia. Systeemeistä käytetään nimiä “iso HDL” ja “pieni HDL”.

4.1 Voimakenttä, algoritmit ja parametrit

Simulaatioissa käytettiin OPLS-voimakenttää (Optimized Potentials for Liquid Simulations). Integraattorina käytettiin leap-frog -algoritmia [33]. Käytetyn aika-askeleen pi-

tuus oli 2 femtosekuntia ja systeemien koordinaatit tallennettiin sadan pikosekunnin välein. Systeemin keskimääräinen lämpötila pyrittiin pitämään 310 kelvinissä käyttäen Nöse-Hoover -termostaattialgoritmia[22][16]. Paine pidettiin keskimäärin yhdessä baarissa Parrinello-Rahman -barostaattialgoritmillä [25]. Pitkän kantaman vuorovaikutuksien laskemiseen käytettiin Particle mesh Ewald (PME) -menetelmää [7][10]. Atomien sidosten pituudet rajoitettiin LINCS-algoritmillä [15][14]. Simulaatioissa käytettiin periodisia reunaehdoja (engl. periodic boundary conditions).

Termostaattialgoritmia käytettiin säätämään koko systeemin keskimääräistä lämpötilaa sen sijaan että olisi jaettu systeemi pienempiin osiin. Tästä seurasi kineettisen energian epätasainen jakautuminen systeemissä. Vaikka lämpötila pysyikin HDL-hiukkasta ympäröivän veden osalta halutussa arvossa, itse HDL:n lämpötila laski simulaation aikana jonkin verran. Tältä ongelmalta olisi välttytty määrittämällä lämpötila erikseen HDL-hiukkaselle ja liuottimelle. Koska lämpötilan muutos on kuitenkin melko pieni, voidaan olettaa ettei se merkittävästi vaikuta tässä työstä esiteltyihin tuloksiin.

5. TULOKSET

Esimerkiksi HDL-hiukkasen ytimen gyraatiosäde näyttäisi saavuttavan lopullisen arvonsa noin 500 ns simuloinnin jälkeen kummankin tutkitun systeemin tapauksessa. Myös muut tutkitut ominaisuudet näyttäisivät konvergoituvan viimeistään tässä kohtaa simulatiota, joten systeemien voidaan olettaa saavuttaneen tasapainon. Termostaattialgoritmin ongelmista johtuva lämpötilan aleneminen saattoi hidastaa systeemin tasapainottumista. Kaikkiin analyyseihin käytettiin 500 ns simuloinnin jälkeen kerättyä dataa, ja simulaation alkuosa hylättiin.

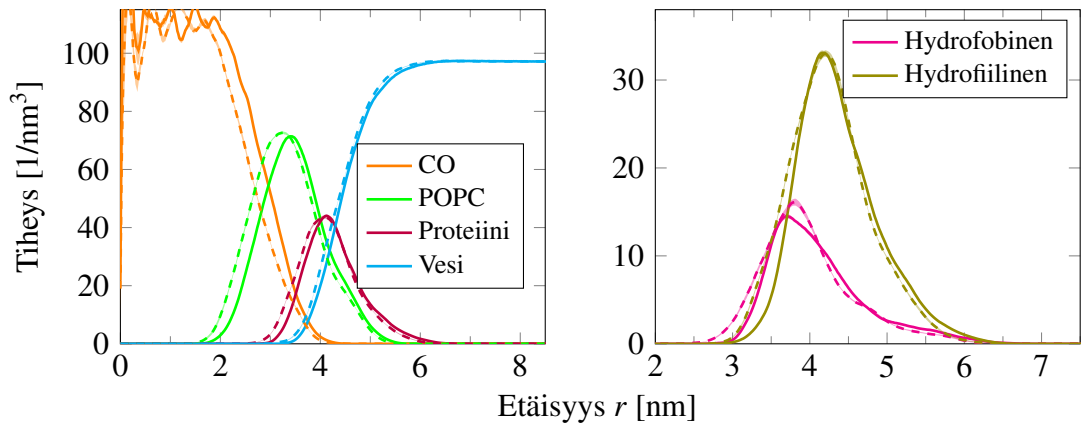
5.1 HDL:n koko ja rakenne

HDL:n komponenttien radiaalinen tiheys on esitetty kuvassa 5.1a. Kolesteryylioleaatti muodostaa hydrofobisen ytimen, jonka ympärillä on POPC-kerros. Näiden jakaumat ovat kuitenkin merkittävästi päällekkäin, joten kerrosten ero on häilyvä, kuten aiemmissakin tutkimuksissa on todettu [36]. Proteiinit ovat asettuneet lipidirakkulan pinnalle fosfolipidien pääryhmien lomaan. Fosfolipidien pääryhmät sijaitsevat keskimäärin 4.4 nm (iso HDL) tai 4.3 nm (pieni HDL) etäisyydellä hiukkasen massakeskipisteestä.

Atomitiheyksien perusteella laskettu HDL:n koko on esitetty taulukossa 5.1. Myös pelkän lipidirakkulan sekä hydrofobisen ytimen koot laskettiin samaan tapaan, ja nämäkin arvot on esitetty samassa taulukossa. Lisäksi laskettiin HDL:n gyraatiosäde, joka oli isossa systeemissä $3,83 \pm 0,02$ nm sekä pienessä systeemissä $3,76 \pm 0,03$ nm. Koon perusteella tutkitut HDL-hiukkaset sopisivat HDL:n alaluokista parhaiten luokkaan 3C tai 3B, jos verrataan Huangin artikkelissa [17] esitettyihin tuloksiin.

Taulukko 5.1: HDL-hiukkasen koko ja fosfolipidikerroksen ominaisuudet. Säde laskettiin atomien tiheysjakaumien perusteella. Fosfolipidikalvon paksuus laskettiin pääryhmän ja sn1-hiiliketjun pään etäisyyksien (HDL:n keskipisteestä) erotuksena. Pinta-ala per lipidi-pääryhmä laskettiin kaavalla 3.7.

	Iso HDL	Pieni HDL
Ytimen säde [nm]	$2,96 \pm 0,03$	$2,69 \pm 0,03$
Lipidirakkulan säde [nm]	$3,90 \pm 0,02$	$3,81 \pm 0,02$
Koko hiukkasen säde [nm]	$4,48 \pm 0,02$	$4,43 \pm 0,02$
Pääryhmän sijainti [nm]	$4,44 \pm 0,02$	$4,32 \pm 0,02$
Kalvon paksuus [nm]	$1,42 \pm 0,03$	$1,47 \pm 0,04$
Pinta-ala per lipidi-pääryhmä [nm ²]	$0,75 \pm 0,02$	$0,64 \pm 0,02$



(a) Systemin eri komponentit.

(b) Proteiinien hydrofobiset ja hydrofiiliset aminohapot.

Kuva 5.1: Radiaalinen atomitiheys etäisyydellä r HDL:n massakeskipisteestä. Yhtenäiset viivat kuvaavat isoa systeemiä ja katkoviivat kuvaavat pientä systeemiä.

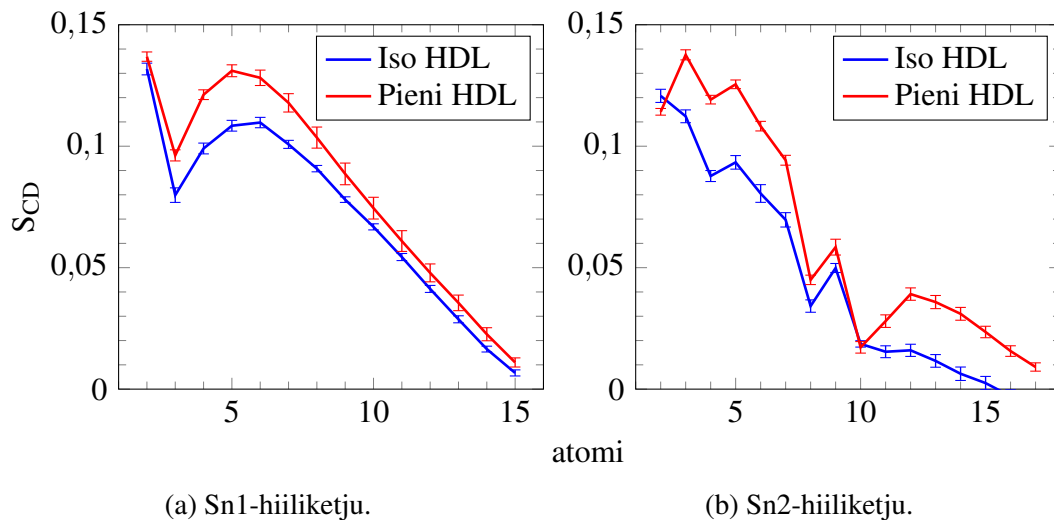
Fosfolipidien järjestyneisyys on esitetty kuvassa 5.2. Kaksoiskalvoon [26] verrattuna ainakin POPC:n sn1-ketju on HDL-hiukkasessa jonkin verran epäjärjestyneempi. Sama trendi on havaittu myös muissa laskennallisissa tutkimuksissa [3]. Kokeellisesti mitattuja järjestysparametreja HDL:n kaltaisten hiukkasten fosfolipideille on hankalampi löytää. Pienessä systeemissä POPC on hieman järjestyneempi kuin isossa systeemissä. Syynä lienee lipidien tiukempi pakkautuminen.

Ison ja pienen systeemin fosfolipidikalvojen paksuudeksi mitattiin $1,42 \pm 0,03$ nm ja $1,47 \pm 0,04$ nm. Vesi-triglyseridi -rajapinnassa sijaitsevan POPC-kalvon paksuudeksi on eräissä laskennallisissa tutkimuksissa määritetty $1,75 \pm 0,11$ nm [13]. HDL:n fosfolipidikalvon voisi olettaa olevan ohuempi, koska lipidit ovat epäjärjestyneempiä. Pinta-ala per lipidipääryhmä oli isossa HDL-hiukkasessa $0,75 \pm 0,02$ nm² ja pienessä HDL-hiukkasessa $0,64 \pm 0,02$ nm², joka on erittäin lähellä Huangin artikkelissa [17] ilmoitettua arvoa $0,65$ nm².

SASA-laskujen tulokset on esitetty taulukossa 5.2. Proteiini peittää HDL:n pinnasta alle puolet, mikä on merkittävästi vähemmän kuin kokeellisissa tutkimuksissa. Huangin artikkelin [17] mukaan tämän kokoisissa hiukkasissa proteiini peittäisi yli 70 % hiukkasen pinnasta.

Taulukko 5.2: Liuottimen (veden) saavutettavissa oleva pinta-ala (SASA). Taulukossa on esitetty absoluuttinen arvo nanometreinä koko hiukkaselle, sekä eritelty eri komponenttien prosentuaalinen osuus.

	HDL [nm ²]	Proteiini [%]	POPC [%]	CO [%]
Iso HDL	949 ± 7	46 ± 1	47 ± 1	7 ± 1
Pieni HDL	920 ± 2	47 ± 1	46 ± 1	7 ± 1



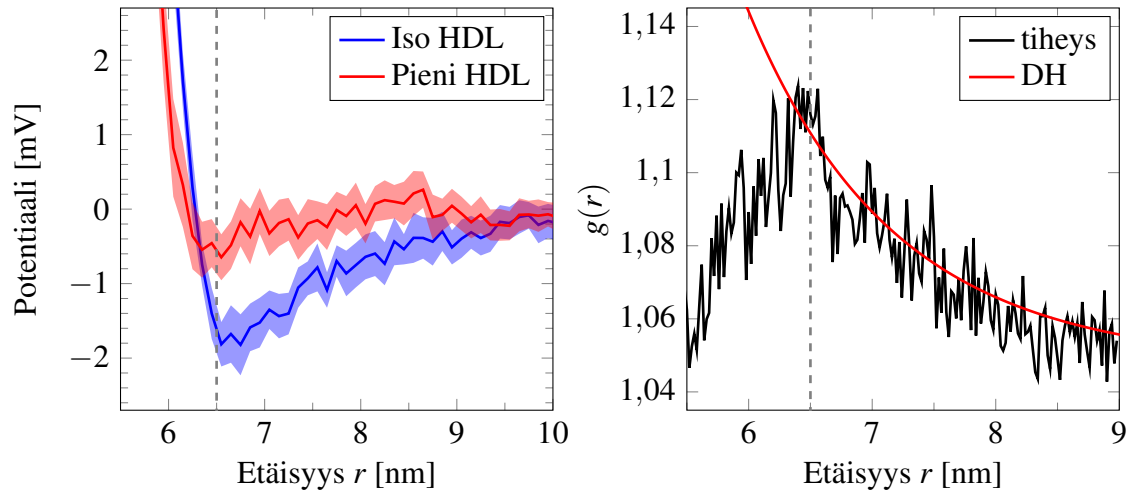
Kuva 5.2: Fosfolipidien hiiliketjujen järjestysparametrit.

5.2 Proteiinien konformaatio

DSSP-analyysin perusteella vain 33 ± 2 prosenttia ison HDL:n ja 31 ± 1 prosenttia pienen HDL:n proteiinien sekundaarirakenteesta on alfa-heliksiä. Tämä on huomattavasti vähemmän kuin kokeellisissa tutkimuksissa on havaittu. Simulaation alkurakenteessa noin 91 prosenttia sekundaarirakenteesta oli alfa-heliksiä. Heliksi purkautui varsinkin ensimmäisessä tyhjiössä tapahtuneessa tasapainotussimulaatiossa rajusti, mikä selittää alhaisen lukeman. Parempia tuloksia voitaisiin saada maltillisemmalla systeemin tasapainotuksella, käyttäen keinotekoisia rajoitteita estämään sekundaarirakenteen purkautumista. Systeemiä voisi myös ensiksi simuloida karkeistetulla voimakentällä, kunnes proteiini saadaan asettumaan paikoilleen, ja tämän jälkeen muuntaa karkeistettu systeemi atomistiseksi. Näin onkin myöhemmissä tutkimuksissa tehty hyvin tuloksin.

Visuaalisen tarkastelun perusteella näyttäisi, että proteiinit eivät niinkään ole kiertyneet lipidirakkulan ympärille, kuten Huang ym. esittävät artikkelissaan [17], vaan pikemminkin proteiiniketjuista koostuvat lenkit ovat romahtaneet satunnaisesti lipidirakkulan pinnalle. Sekundaarirakenteen purkautumisen ansiosta proteiinit voivat pakkautua pienempään tilaan kääntymällä mutkalle. Alfaheliksi on melko jäykkä rakenne, joten ilman sekundaarirakenteen purkautumista tilanne olisi varmastikin erilainen. Sekundaarirakenteen purkautumisesta huolimatta apoA-I -molekyylien väliset sidokset näyttäisivät visuaalisen tarkastelun perusteella säilyvän simulaation aikana ainakin osittain. Pienellä ja isolla systeemillä ei ole merkittävää eroa proteiinin konformaation suhteen, koska pienen systeemin alkurakenteen valmistamiseen käytettiin ison systeemin simulaatiosta otettua rakennetta, jossa proteiinit olivat jo asettuneet lipidirakkulan pintaan.

Kuvassa 5.1b on esitetty proteiinien hydrofobisten ja hydrofilisten aminohappojen tiheys eri etäisyyksillä HDL-hiukkasen keskipisteestä. Hydrofobisiksi aminohapoiksi las-



(a) Sähköstaattinen potentiaali etäisyydellä r HDL:n massakeskipisteestä.

(b) Debye-Hückel -käyrä (DH) sovitettuna natrium-ionien radiaaliseen tiheysfunktioon.

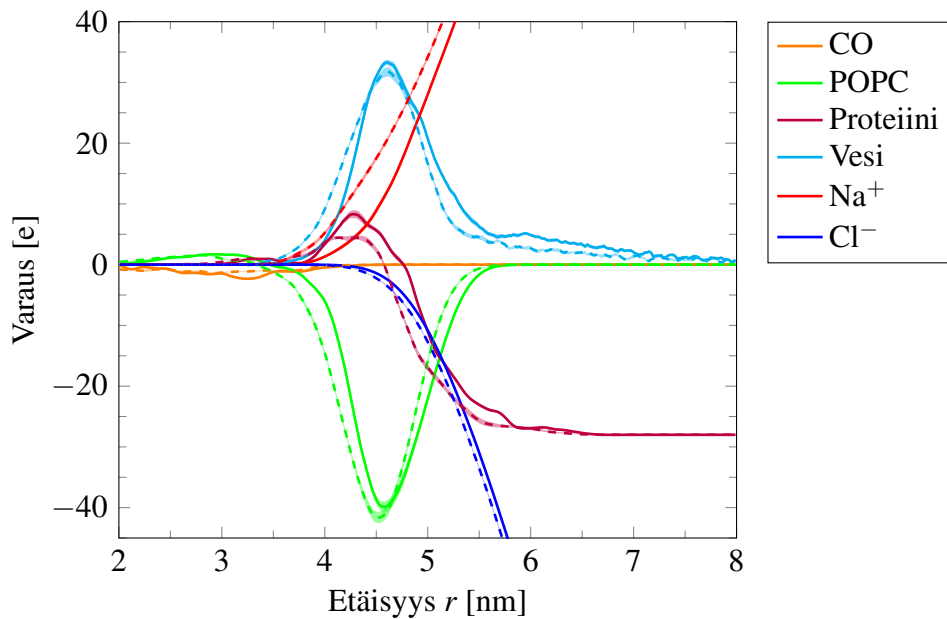
Kuva 5.3: Zeta-potentiaalin määrittäminen sähköstaattisesta potentiaalista. Ison HDL:n arvioitu liukupinnan sijainti 6,5 nm on merkitty kuvaan harmaalla katkoviivalla.

kettiin ne aminohapot, jotka ovat Wimley-White rajapintahydrofobisuusasteikon (engl. interface hydrophobicity scale) [37] mukaan hydrofobisia. Hydrofobiset aminohapot sijaitsevat selvästi hieman lähempänä HDL:n keskipistettä. Tämä viittaa siihen, että amfipaatit kääntyvät sellaiseen asentoon, jossa hydrofobiset osat osoittavat kohti lipidejä, kuten Vuorela ym. mainitsevat artikkelissaan [36].

5.3 Sähköstaattinen potentiaali

Kuvassa 5.3b on esitetty ison HDL:n liukupinnan määrittäminen natrium-ionien radiaalisesta tiheysfunktioista. Ionien tiheysjakauma ei ole läheskään yhtä tasainen kuin Heikkilän artikkelin [12] kultananopartikkelin tapauksessa, koska systeemin varaus on pienempi, mutta koko paljon suurempi, jolloin varaustiheys jää paljon alhaisemmaksi. Myös HDL:n epäsymmetrisyydellä on oma vaikutuksensa. Liukupintaa ei siis voida määrittää kovin luotettavasti, mutta jonkinlainen suuntaa antava arvio voidaan tehdä. Tiheysfunktioon sovitettu Debye-Hückel -käyrä (kaava 3.10) kuvaa tiheysfunktiota melko hyvin suurilla r :n arvoilla, mutta ei enää pienemmillä arvoilla kuin 6,5 nanometriä. Tällä perusteella liukupinnan säteeksi voidaan määrittää $r = 6,5$ nm, mikä on merkitty kuvaan katkoviivalla. Vastavasti pienemmälle systeemille saadaan liukupinnan säteeksi 6,4 nanometriä (kuvaaja ei ole esitetty).

Ison ja pienen HDL:n sähköstaattiset potentiaalit on esitetty kuvassa 5.3a. Kuvasta nähdään että ison HDL:n potentiaali on minimissään 1,8 mV, ja katkoviivalla merkitty liukupinta osuu lähelle minimiä. Tarkalleen ottaen potentiaali liukupinnan kohdalla, eli zeta-potentiaali, on $-1,6 \pm 0,4$ mV. Pienen HDL:n zeta-potentiaali on vastaavasti $-0,5 \pm 0,4$

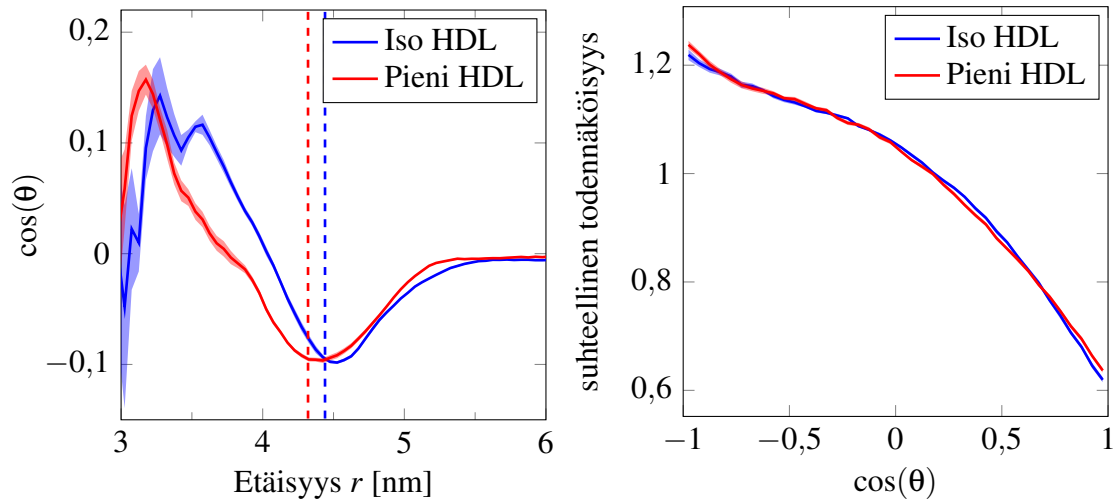


Kuva 5.4: Systeemin komponenttien kumulatiivinen varaus etäisyydellä r HDL:n massakeskipisteestä. Yhtenäiset viivat kuvaavat isoa HDL:ää ja katkoviivat kuvaavat pientä HDL:ää.

mV. Kumpikin tulos on itseisarvoltaan selvästi pienempi kuin aiemmin mainittu kokeellisesti määritetty zeta-potentiaali, joka oli noin -12 mV. Potentiaalın keskivirhe on myös yllättävän suuri siihen nähden että laskuihin on käytetty yli mikrosekunnin verran simulaatiodataa. Tarkempi zeta-potentiaalın määrittäminen edellyttänee todella pitkiä simulaatioita. Simulaatioista tulisi myös tehdä useampia rinnakkaisia kopioita, jotta voidaan todeta tulosten toistettavuus.

Systeemien zeta-potentiaalien eron syyn selvittämiseksi voidaan tarkastella miten systeemin eri komponentit vaikuttavat potentiaaliin. Kuvassa 5.4 on esitetty systeemin kunkin eri komponentin kumulatiivinen varaus. Fosfolipidien polaariset pääryhmät aiheuttavat negatiivisen varauksen hiukkasen pinnan kohdalle. Vesimolekyylit orientoituvat lipidipääryhmien läheisyydessä siten, että ne neutraloivat lipidien varauksen suurimmaksi osaksi. Vesimolekyylit ovat jonkin verran orientoituneita vielä melko kaukana HDL:n pinnasta, sillä vielä 7 nm etäisyydellä HDL:n keskipisteestä on havaittavissa veden aiheuttamaa positiivista varausta. ApoA-I -proteiinilla on negatiivinen kokonaisvaraus, mutta hiukkasen pinnan läheisyydessä apoA-I:n aiheuttama kumulatiivinen varaus on hieman positiivinen. Natrium-ionit ovat keskimäärin hieman lähempänä hiukkasen pintaa kuin kloori-ionit, joten ionien kokonaisvaikutus varaukseen hiukkasen pinnalla on positiivinen. Hydrofobinen kolesteryylioleaatti ei juurikaan vaikuta systeemin varaukseen.

Pienessä systeemissä kaikkien komponenttien vaikutus näkyy luonnollisesti hieman lähempänä HDL:n keskipistettä, mutta natrium-ionit näyttäisivät olevan muihin komponentteihin verrattuna lähempänä. Tämä saattaa olla selitys pienen ja ison HDL:n zeta-



(a) Vesimolekyylien orientaatio etäisyydellä r HDL:n massakeskipisteestä.

(b) Vesimolekyylien orientaatiojakauma fosfolipidien pääryhmän kohdalla.

Kuva 5.5: Vesimolekyylien keskimääräinen orientaatio HDL:n läheisyydessä. Kulma θ on HDL:n pinnan normaalin ja vesimolekyylin happiatomista vetyatomien keskipisteeseen kulkevan vektorin välinen kulma. Vesimolekyylin happiatomin osoittaessa kohti HDL-hiukkasta $\cos(\theta)$ on positiivinen ja happiatomin osoittaessa pois päin HDL-hiukkasesta $\cos(\theta)$ on negatiivinen. Kaukana HDL:n pinnasta $\cos(\theta)$ lähestyy nollaa, eli orientaatio katoaa. Katkoviivat osoittavat fosfolipidien pääryhmän keskimääräisen sijainnin.

potentiaalien erolle. Visuaalisessa tarkastelussa havaittiin yli nanosekunnin kestäviä kontakteja natrium-ionien ja HDL:n välillä, joten mahdollisesti pienessä systeemissä tällaisia kontakteja on sattumalta enemmän. On myös mahdollista että simulaatioissa ionit sitoutuvat epärealistisen voimakkaasti lipideihin, mikä selittäisi miksi kummankin systeemin zeta-potentiaali on paljon positiivisempi kuin sen todellisuudessa pitäisi olla. Veren suola ei myöskään ole puhdasta natriumkloridia, vaan todellisuudessa veressä on myös kaliumia ja muita positiivisia ioneja, jotka saattavat käyttäytyä eri tavalla kuin natrium. Aiemmin mainittu kineettisen energian epätasainen jakautuminen saattaa myös edesauttaa natrium-ionien sitoutumista HDL-hiukkasiin.

Kuvassa 5.5a esitetty vesimolekyylien keskimääräinen orientaatio etäisyyden r funktiona vahvistaa kumulatiivisen varauksen perusteella tehdyt päätelmät veden orientoitumisesta. Juuri lipidien pääryhmien kohdalla orientaatiokäyrä saavuttaa miniminsä, eli vesimolekyylien positiivista osittaisvarausta kantavat vetyatomit keskimäärin osoittavat hieman kohti HDL:n keskipistettä. Keskimääräinen orientaatio ei ole montaakaan astetta, mutta vesimolekyylien suuri määrä tekee siitä merkittävän. Kuvassa 5.5b on esitetty vesimolekyylien orientaatiokulmien jakauma lipidipääryhmien kohdalla. On noin kaksinkertainen todennäköisyys, että vesimolekyylin happiatomi osoittaa pois päin HDL-hiukkasesta, kuin että se osoittaisi kohti HDL-hiukkasta.

6. YHTEENVETO

Kahden simuloidun HDL-hiukkasen ominaisuuksien todettiin vastaavan melko hyvin kokeellisia tuloksia. Mitatut suureet sopivat hyvin yhteen myös muiden molekyyldynamiikkasimulaatiotutkimusten kanssa. Simulaatioissa kuitenkin oli muutama ongelma, joiden takia tuloksista tehtävien johtopäätösten kanssa täytyy olla varovainen. Ensimmäinen ongelma on apoA-I -proteiinien sekundaarirakenteen purkautuminen, joka laski hiukasten alfa-heliksisyyden epäluonnolliselle tasolle. Toinen ongelma oli termostaattialgoritmin huolimattomasta käytöstä johtuva kineettisen energian epätasainen jakautuminen systeemeissä, mikä johti käytännössä HDL-hiukkasten viilentymiseen ja mahdollisesti sitä kautta jähmettymiseen. Tämän epäillään vaikuttavan oleellisesti kaikkiin tuloksiin, etenkin sähköstaattiseen potentiaaliin. Ongelmista huolimatta tässä työssä esiteltyä HDL-hiukkasmallia on hyödynnetty jo julkaistuissa tutkimuksissa [21].

HDL-hiukkasten zeta-potentiaaleiksi määritettiin $-1,6 \pm 0,4$ mV (isompi hiukkanen) ja $-0,5 \pm 0,4$ mV (pienempi hiukkanen). Aggregoitumisen kannalta oleellista on, että määritetyt arvot ovat negatiivisia kuten kokeellisissa tutkimuksissa on todettu. Määritetyt arvot ovat silti melko kaukana kokeellisesti määritetystä noin -12 millivoltista. Eron syyn selvittäminen edellyttää jatkotutkimuksia, jotka ovat jo käynnissä. Jatkotutkimuksissa edellä mainitut simulaatioiden ongelmat on selvitetty, ja lisäksi tutkitaan mikä on monimutkaisemman lipidikoostumuksen vaikutus.

7. LÄHTEET

- [1] M. P. Allen. Introduction to molecular dynamics simulation. *Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins*, 23:1–28, 2004.
- [2] AntiSense. Structure of a lipoprotein. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Structure_of_a_Lipoprotein.png, 2010. Viitattu: 01.12.2014.
- [3] A. Catte, J. C. Patterson, M. K. Jones, W. G. Jerome, D. Bashtovyy, Z. Su, F. Gu, J. Chen, M. P. Aliste, S. C. Harvey, et al. Novel changes in discoidal high density lipoprotein morphology: a molecular dynamics study. *Biophysical journal*, 90(12):4345–4360, 2006.
- [4] M. Chapman, S. Goldstein, D. Lagrange, and P. Laplaud. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *Journal of lipid research*, 22(2):339–358, 1981.
- [5] ChemicalBook Inc. Structural formula of Cholesteryl oleate. http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB2274304_EN.htm, 2016. Viitattu: 10.05.2016.
- [6] B. H. D. van der Spoel, E. Lindahl and the GROMACS development team. *GROMACS User Manual version 4.6.5*, 2013.
- [7] T. Darden, D. York, and L. Pedersen. Particle mesh ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for ewald sums in large systems. *The Journal of chemical physics*, 98(12):10089–10092, 1993.
- [8] Doxepine. Structural formula of 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC). <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:POPC.png>, 2009. Viitattu: 10.05.2016.
- [9] F. Eisenhaber, P. Lijnzaad, P. Argos, C. Sander, and M. Scharf. The double cubic lattice method: Efficient approaches to numerical integration of surface area and volume and to dot surface contouring of molecular assemblies. *Journal of Computational Chemistry*, 16(3):273–284, 1995.

- [10] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L. G. Pedersen. A smooth particle mesh ewald method. *The Journal of chemical physics*, 103(19):8577–8593, 1995.
- [11] S. Goulinet and M. J. Chapman. Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids relevance to oxidative resistance and atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 17(4):786–796, 1997.
- [12] E. Heikkilä, A. A. Gurtovenko, H. Martinez-Seara, H. Häkkinen, I. Vattulainen, and J. Akola. Atomistic simulations of functional Au₁₄₄(SR)₆₀ gold nanoparticles in aqueous environment. 116:9805–9815, 2012.
- [13] G. Henneré, P. Prognon, F. Brion, and I. Nicolis. Molecular dynamics study of a phospholipid monolayer at a water/triglyceride interface: towards lipid emulsion modelling. *Chemistry and physics of lipids*, 157(2):86–93, 2009.
- [14] B. Hess. P-lincs: A parallel linear constraint solver for molecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(1):116–122, 2008.
- [15] B. Hess, H. Bekker, H. J. Berendsen, J. G. Fraaije, et al. Lincs: a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of computational chemistry*, 18(12):1463–1472, 1997.
- [16] W. G. Hoover. Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. *Physical Review A*, 31(3):1695, 1985.
- [17] R. Huang, R. A. G. D. Silva, W. G. Jerome, A. Kontush, M. J. Chapman, L. K. Curtiss, T. J. Hodges, and W. S. Davidson. Apolipoprotein A-I structural organization in high-density lipoproteins isolated from human plasma. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(4):416–422, 2011.
- [18] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten. VMD – Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1):33–38, 1996.
- [19] R. P. Joosten, T. A. H. te Beek, E. Krieger, M. L. Hekkelman, R. W. Hooft, R. Schneider, C. Sander, and G. Vriend. A series of PDB related databases for everyday needs. *Nucleic Acids Research*, 39(Database issue):D411–D419, 2011.
- [20] W. Kabsch and C. Sander. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22(12):2577–2637, 1983.

- [21] T. Karilainen, S. Timr, I. Vattulainen, and P. Jungwirth. Oxidation of cholesterol does not alter significantly its uptake into high-density lipoprotein particles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(13):4594–4600, 2015.
- [22] S. Nosé. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *The Journal of chemical physics*, 81(1):511–519, 1984.
- [23] R. Ohashi. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. 98(12):845–856, 2005.
- [24] O. Ollila, A. Lamberg, M. Lehtivaara, A. Koivuniemi, and I. Vattulainen. Interfacial tension and surface pressure of high density lipoprotein, low density lipoprotein, and related lipid droplets. *Biophysical journal*, 103(6):1236–1244, 2012.
- [25] M. Parrinello and A. Rahman. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied physics*, 52(12):7182–7190, 1981.
- [26] J. Seelig and N. Waespe-Sarcevic. Molecular order in cis and trans unsaturated phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 17(16):3310–3315, 1978.
- [27] J. P. Segrest, M. K. Jones, A. E. Klon, C. J. Sheldahl, M. Hellinger, H. De Loof, and S. C. Harvey. A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. 274(45):31755–31758, 1999.
- [28] R. A. G. D. Silva, R. Huang, J. Morris, J. Fang, E. O. Gracheva, G. Ren, A. Kontush, W. G. Jerome, K.-A. Rye, and W. S. Davidson. Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(34):12176–12181, 2008.
- [29] D. L. Sparks and M. C. Phillips. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. *Journal of lipid research*, 33:123–130, 1992.
- [30] O. Tange. Gnu parallel - the command-line power tool. ;*login: The USENIX Magazine*, 36(1):42–47, 2011.
- [31] P. P. Toth. The “good cholesterol”: High-density lipoprotein. *Circulation*, 111(5):e89–e91, 2005.
- [32] S. van der Walt, S. C. Colbert, and G. Varoquaux. The numpy array: A structure for efficient numerical computation. *Computing in Science Engineering*, 13(2):22–30, 2011.
- [33] W. Van Gunsteren and H. Berendsen. A leap-frog algorithm for stochastic dynamics. *Molecular Simulation*, 1(3):173–185, 1988.

- [34] L. S. Vermeer, B. L. de Groot, V. Réat, A. Milon, and J. Czaplicki. Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers: computation from molecular dynamics simulations and comparison with ^2H NMR experiments. *European biophysics journal*, 36(8):919–931, 2007.
- [35] A. von Eckardstein, J.-R. Nofer, and G. Assmann. High density lipoproteins and arteriosclerosis: Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(1):13–27, 2001.
- [36] T. Vuorela, A. Cattaui, P. Niemelä, A. Hall, M. Hyvönen, S. Marrink, M. Karttunen, and I. Vattulainen. Role of lipids in spheroidal high density lipoproteins. *PLoS computational biology*, 6(10):e1000964, 2010.
- [37] W. C. Wimley and S. H. White. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nature Structural & Molecular Biology*, 3(10):842–848, 1996.
- [38] W.-L. Zhang, X. Gu, H. Bai, R.-H. Yang, C.-D. Dong, and J.-P. Liu. Nanostructured lipid carriers constituted from high-density lipoprotein components for delivery of a lipophilic cardiovascular drug. *International Journal of Pharmaceutics*, 391(1–2):313 – 321, 2010.