

University of Groningen

Of Stalks and Diamonds. Simulation Studies of Membrane Fusion and the Role of Fusion Peptides

Fuhrmans, Marc

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2010

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Fuhrmans, M. (2010). *Of Stalks and Diamonds. Simulation Studies of Membrane Fusion and the Role of Fusion Peptides*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 7

Summary and outlook

And hast thou slain the Jabberwock?

Lewis Carroll

For the main part of the research presented in this thesis, the focus is on how fusion between lipid membranes proceeds.

We started with the direct simulation of vesicle fusion in the absence of fusion-inducing agents (Chapter 3). Using an older version of the MARTINI forcefield, we observed an alternative fusion pathway, that differs from the commonly assumed radial expansion of the initial connection between the vesicles' outer monolayers. In this pathway, the so-called stalk does not increase its area by simultaneously expanding in two dimensions but rather elongates in a linear fashion following a roughly circular path. This elongation is accompanied by the formation of a pore adjacent to the stalk in one of the membranes of the vesicles. By finishing the circular elongation until the two ends of the stalk merge and by expansion of the pore until the lipids constituting the porated membrane patch enclosed by the circular stalk are completely absorbed into the vesicle's inner monolayer, the hemifused state in which the vesicle interiors are separated by a single bilayer is reached. Rupture of this hemifusion diaphragm completes the fusion process.

The main differences of this alternative fusion pathway compared to the radial expansion is the occurrence of a stalk-pore complex as an intermediate stage, and the possibility that fusion-inducing agents outside the vesicle do in principle have access to the hemifusion diaphragm. Both of these have implications on the possible mode of action of fusion-inducing agents.

After we switched to the current version of the MARTINI model, formation of stalks and further progression towards fusion when starting from preformed stalks did no longer occur spontaneously in the systems simulated, indicating a strong sensitivity of the fusogenicity to the model used. Given a sufficiently fusogenic model, however, molecular dynamics simulation of vesicle fusion is a viable method to study the fusion process, and presents an attractive option to observe the effects of fusion-inducing agents in the future.

An interesting continuation of our simulations would be to determine the effects of the conditions (*e.g.* tension, curvature, temperature, composition and

presence of fusion-inducing agents) on the pathway chosen, which best would be complemented by a systematic experimental study. In addition, experiments and simulations searching for the presence of fusion-inducing agents originating from outside the vesicles in the inner monolayer of fused vesicles might be a worthwhile endeavor.

Our further studies focused on the influenza HA fusion peptide as an agent of fusion (Chapter 4). Due to the difficulties with the simulation of fusion with the current version of our forcefield, we chose to study the peptide's effects in a more abstract manner. In one approach, we investigated stalk formation forced by dehydration of two closely apposed bilayers. These studies were complemented by a more general setup in which the simulations were started from a random mixture of lipids, solvent and peptides to determine the phases that spontaneously assemble. By comparing the adopted phases to the ones adopted in the absence of peptides, conclusions in terms of changes in preferred curvature could be drawn.

We were not able to observe a facilitation of stalk formation between two bilayers at low hydration. While this effect might have been masked by the additional volume of the peptides mimicking a higher level of hydration, an increased surface area of isolated bilayers in the presence of the peptides indicates a more positive spontaneous mean curvature, making a stabilization of stalks as structures with an overall negative mean curvature relative to planar bilayers unlikely.

The phases spontaneously formed in simulations starting from mixtures of lipids and water at random coordinates indicate a systematic shift of the phase diagram towards more positive mean curvature in the presence of the peptides. In particular, the lamellar phase was favored over the stalk phase, and the stalk phase over the inverted hexagonal phase. For the latter phase boundary, the wildtype peptides were found to have a larger effect than the non-fusogenic G1V and W14A mutants, which appears to be connected to the ability of the wildtype peptides to align with the positive curvature component of the stalks with their boomerang shape. As a separate phenomenon, we observed the formation of bicontinuous cubic phases, both for the wildtype and mutant peptides, indicating a stabilization of negative Gaussian curvature.

A possible rationalization of these effects is that the peptides induce a positive curvature component, both via their additional contribution to the surface and, in the case of the wildtype peptides, via their kinked structure. This positive curvature can manifest as an overall increased mean curvature. However, the induction of positive curvature can also be limited to only one of the two principal curvatures and be compensated by a drop in the other and thereby manifest as negative Gaussian curvature. While this formation of saddle-splay curvature is normally associated with a significant energetic penalty, the peptides' preferred location in regions of high Gaussian curvature might act to lower the energetic costs by replacing the lipids in those areas. The peptides might therefore possess a dual role in the induction of bicontinuous cubic phases, forcing a positive curvature component on the system and lowering the energetic costs of Gaussian curvature.

Which bicontinuous phase is adopted is found to depend on the peptide present,

with the wildtype inducing the single diamond phase and the G1V and W14A mutants inducing the double diamond phase in consistence with the wildtype's higher ability to stabilize a positive curvature component due to its kinked shape. While the stabilization of double bicontinuous cubic phases is normally associated with peptides that facilitate fusion, this relation is also not strict in experimental results, suggesting an involvement of the fusion peptides in a different stage of the fusion process. The formation of the single diamond phase in the presence of the wildtype peptides might indicate an importance of stalk-pore complexes, which have been observed as intermediate states of vesicle fusion in simulations.

Judging from our conclusions on their effects on curvature, the peptides are also likely to lower the energy of pores, which poses another option for their role in the fusion pathway. A possible extension of our studies would therefore be to perform simulations of spontaneous aggregation using a lipid with a tendency to form pores to assess the peptide's effects on pore formation. In addition, it would be interesting to quantify the peptides' effects on curvature, for example by measuring the work needed to impose a certain amount of Gaussian or mean curvature on a planar membrane patch. And, thinking of our studies on vesicle fusion, it would be worthwhile to directly demonstrate the peptides' proposed effect on membrane fusion by including them in our setup for vesicle fusion.

Another topic described in this thesis, inspired by the complex shapes of the phases adopted by lipids in general and the need for a large number of morphological analyses for our work in particular, is the implementation of a program to perform quantitative morphological analyses of coordinates obtained from computer simulations (Chapter 5). This is accomplished by first creating a three-dimensional image of the molecular aggregate composed of black and white cubic voxels, that can then be characterized using the well-established technique of morphological image analysis. In addition, we extended the analysis to also obtain local curvatures and create an image of the molecular aggregate onto which the curvatures are mapped as a color code.

While the accuracy of some of the properties determined by this kind of analysis is limited by the necessity of translation into a rasterized image, the values obtained were demonstrated to be sufficient for a broad range of applications, allowing the monitoring of dynamic processes such as self assembly and stalk and pore formation, as well as a comparative analysis of similar structures.

The program is in principle ready to use in applications. Nevertheless, it would benefit from an optimization of computational efficiency, as well as from a refinement of the way in which the local curvatures are visualized. In particular, a mapping of the curvatures onto the atoms of the molecules or onto isosurfaces representing the aggregate's surface would greatly enhance the presentation.

Even in its current state, however, the program can be expected to greatly facilitate any application requiring the detection of morphological characteristics, especially when a large number of simulations has to be analyzed. In addition, in simulations in which one is only interested in the occurrence of a key event that is characterized by a change in morphology (*e.g.* self assembly, pore closure or

membrane rupture), computer time could be saved by writing a script to monitor the output coordinates at regular intervals and stop the simulation once the event occurred, allowing to automatically run and screen a large number of simulations.

Apart from facilitation and automation of other tasks, morphological analysis is also an interesting option for the description of molecular aggregates in its own right. With the accessible system sizes steadily increasing, the description of large scale behavior can be expected to become more and more important in the analysis of computer simulations. In addition, since the molecular detail is still available from the simulations, the implemented determination of the local curvatures could be used to relate microscopic phenomena like lipid structure, (partial) demixing of lipid mixtures, or the positioning of peptides in lipid aggregates to the macroscopic local curvature.

Finally, in a somewhat different area of research, we showed that it is possible to introduce bundling to the widely-used SPC water model by using restraining potentials (Chapter 6). The rise in density resulting from the bundling could be compensated by an increase of the non-bonded repulsion between the water molecules.

Two models bundling groups of four water molecules (as required for their intended use in multiscaling simulations) were presented that differ mainly in the rigidity of the bundles. In both of these models, the bundling affects mainly the structure and dynamics of water, but preserves the interactions with small molecules as reflected by their free energies of hydration. However, sample applications involving biomolecular systems indicate that a too strong bundling can lead to artifacts due to increased penetration of water molecules into the biomolecules. We can therefore predict that the best model is the one which only uses the minimum bundling strength required to keep the bundles compact enough for multiscaling simulations, even though the final parametrization of the bundled water models has to wait until the multiscaling algorithms have been sufficiently developed.

Nederlandse samenvatting

Bij het grootste gedeelte van het onderzoek, gepresenteerd in dit proefschrift, ligt de focus op fusie tussen lipidemembranen.

We begonnen met de directe simulatie van vesikelfusie zonder de aanwezigheid van fusie-inducerende reagentia (Hoofdstuk 3). Met een oudere versie van het MARTINI krachtenveld zagen we een alternatief fusiepad, dat verschilt van de radiale uitbreiding van de initiële connectie tussen de buitenste monolagen van de fuserende vesikels, zoals algemeen wordt aangenomen. Bij dit fusiepad vergroot de zogenaamde stalk zijn oppervlakte niet door gelijktijdig uitbreiden in twee richtingen, maar verlengt hij zich lineair via een grofweg cirkelvormig pad. Dit verlengen gaat samen met het vormen van een porie naast de stalk in een van de membranen van de vesikels. Doordat de cirkelvormige verlenging van de stalk doorgaat totdat de twee uiteinden samenkomen en door het uitbreiden van de porie totdat de lipiden in het geporeerde en in het door de circulaire stalk ingesloten gedeelte van het membraan geheel zijn opgenomen in de binnenste monolaag van de vesikel wordt een hemifusietoestand bereikt, waarbij de binnensten van de vesikels slechts gescheiden zijn door een enkele bilaag. Het scheuren van dit hemifusiediafragma voltooit de fusie.

Het belangrijkste verschil tussen dit alternatieve fusiepad en het radiale expansiepad is de vorming van een stalk-poriecomplex als een tussenstadium en de mogelijkheid dat fusie-inducerende reagentia buiten de vesikel in principe toegang hebben tot het hemifusiediafragma. Beiden zijn van invloed op de mogelijke wijzen waarop fusie-inducerende reagentia kunnen werken.

Nadat we waren overgestapt naar de huidige versie van het MARTINI model vond de formatie van stalks en ook het voortzetten van fusie in voorgevormde stalks niet meer spontaan plaats. Dit wijst er op dat de fusiebereidheid sterk afhankelijk is van het gebruikte model. Voor een voldoende fusiebereid systeem zijn moleculaire dynamica simulaties echter een bruikbare methode om de vesikelfusie te bestuderen en vormen zij een aantrekkelijke optie om in de toekomst de effecten van fusie-inducerende reagentia te bestuderen.

Een interessante voortzetting van onze simulaties zou het bepalen van de invloed van omstandigheden (bijvoorbeeld: spanning, kromming, temperatuur en samenstelling van het membraan en de aanwezigheid van fusie-inducerende reagentia) op het fusiepad zijn, bij voorkeur in combinatie met een systematische experimentele studie. Bovendien kunnen experimenten en simulaties die zoeken naar fusie-inducerende reagentia in de binnenste monolaag van gefuseerde vesikels, afkomstig van buiten de vesikels, de moeite waard zijn.

Het vervolg van onze studies richtte zich op de influenza HA fusiepeptiden als fusie-inducerende reagentia (Hoofdstuk 4). Door de problemen met het simuleren van fusie met de huidige versie van ons krachtenveld, besloten we de effecten van de peptiden op een meer abstracte manier te bestuderen. In een benadering onderzochten we stalkvorming, opgewekt door het dehydrateren van twee nabije bilagen.

Deze studies werden gecombineerd met een meer algemene aanpak, waarbij de simulaties werden gestart van een willekeurig mengsel van lipiden, oplosmiddel en peptiden, om zo te bepalen welke fases zich spontaan vormen. Door de gevormde fases te vergelijken met de fases die in afwezigheid van peptiden vormden, konden conclusies getrokken worden over veranderingen in voorkeurskromming.

Het bleek niet mogelijk stalkvorming tussen twee bilagen, gefaciliteerd door een lage hydratatie, waar te nemen. Een toegenomen oppervlakte van geïsoleerde bilagen in het bijzijn van peptiden wijst op meer positieve spontane gemiddelde kromming, hetgeen de stabilisatie van stalks (die een totale negatieve kromming hebben) ten opzichte van vlakke bilagen onwaarschijnlijk maakt. Echter, de peptiden bootsen ook het effect van hogere hydratatie na, hetgeen ook stalkvorming tegengaat en niet te onderscheiden is van de invloed van de veranderde kromming.

De fases die spontaan vormen in simulaties gestart met een mix van lipiden en water op willekeurige posities laten een systematische verschuiving van het fase-diagram zien, in de richting van positieve gemiddelde kromming, wanneer peptiden aanwezig zijn. Ofwel, er trad een verschuiving op van de stalkfase naar de laminaire fase en van de geïnverteerde hexagonale fase naar de stalkfase. Voor de fasegrens tussen deze laatste twee werd gevonden dat de wildtype peptiden een groter effect hebben dan de niet-fusie-inducerende G1V en W14A mutanten. Dit lijkt te zijn verbonden met het vermogen van wildtype peptiden om met hun boemerangvorm langs de positieve krommingscomponent van de stalk te kunnen liggen. Als een losstaand fenomeen namen we de formatie van bicontinue kubische fases waar, zowel met wildtype als met gemuteerde peptiden, hetgeen wijst op een stabilisatie van negatieve Gaussische kromming.

Een mogelijke verklaring van deze effecten is dat de peptiden een positieve krommingscomponent veroorzaken, zowel via hun extra bijdrage aan de oppervlakte en, in het geval van de wildtype peptiden, via hun geknikte structuur. Deze positieve kromming kan zich manifesteren als een toegenomen gemiddelde kromming. Echter, het veroorzaken van positieve kromming kan ook beperkt zijn tot slechts een van de twee hoofdkrommingen en gecompenseerd worden door een afname in de andere en hierdoor zichtbaar worden als negatieve Gaussische kromming. Hoewel Gaussische kromming normaal samengaat met significante energetische kosten, is het mogelijk dat de peptiden, die zich voornamelijk in gebieden van hoge Gaussische kromming bevinden, in dit geval zorgen voor een verlaging van de energetische kosten door het vervangen van lipiden in deze gebieden. De peptiden zouden dus een dubbele rol kunnen spelen bij het induceren van de bicontinue kubische fase: door een positieve krommingscomponent aan het systeem te geven en door het verlagen van de energetische kosten van Gaussische kromming.

Welke bicontinue fase wordt aangenomen blijkt af te hangen van het aanwezige peptide, waarbij het wildtype de enkele diamantfase veroorzaakt en de G1V en W14A mutanten de dubbele diamantfase, hetgeen consistent is met het sterkere vermogen van het wildtype om de positieve krommingscomponent te stabiliseren door zijn geknikte vorm. Hoewel de stabilisatie van dubbele bicontinue kubische fases meestal geassocieerd wordt met peptiden die fusie veroorzaken, is dit ook in

experimentele resultaten geen strikte relatie, wat de betrokkenheid van fusiepeptiden in een ander stadium van het fusieproces suggereert. De formatie van de enkele diamantfase in het bijzijn van wildtype peptiden kan wijzen op een belangrijke rol voor stalk-poriecomplexen, welke zijn waargenomen als overgangsfase van vesikelfusie in simulaties.

Op basis van onze conclusies over hun effect op kromming, zullen peptiden waarschijnlijk ook de energie van porieën verlagen, hetgeen nog een optie zou kunnen zijn voor hun rol in het fusieproces. Een mogelijke uitbreiding van onze studie zou het doen van simulaties van spontane aggregatie zijn, waarbij een lipide met de neiging om porieën te vormen gebruikt wordt. Zo kunnen de effecten van peptiden op porievorming worden onderzocht. Bovendien zou het interessant zijn om het effect dat peptiden op kromming hebben te quantificeren, bijvoorbeeld door te meten hoeveel arbeid nodig is om een bepaalde hoeveelheid Gaussische of gemiddelde kromming aan te brengen op een vlakke membraan. En, denkend aan onze studie naar vesikelfusie, zou het de moeite waard zijn om het voorgestelde effect van peptiden op membraanfusie direct aan te tonen, door ze aan ons systeem voor vesikelfusie toe te voegen.

Een ander onderwerp dat wordt beschreven in dit proefschrift, geïnspireerd door de complexe vormen van de fases aangenomen door lipiden in het algemeen en de behoefte aan een groot aantal morfologische analyses van ons werk in het bijzonder, is de implementatie van een programma om kwantitatieve morfologische analyses uit te voeren, op basis van coördinaten verkregen uit computersimulaties (Hoofdstuk 5). Dit is bewerkstelligd door eerst een drie-dimensionale figuur van het moleculaire aggregaat te creëren, bestaande uit zwarte en witte kubische voxels. Deze figuur kan vervolgens gekarakteriseerd worden, door gebruik van de gevestigde techniek van morfologische figuuranalyse. Als aanvulling hierop breiden we de analyse uit om ook de lokale kromming te verkrijgen en een figuur van het moleculaire aggregaat te creëren waarop de krommingen geprojecteerd worden als een kleurcode.

De nauwkeurigheid van sommige van de eigenschappen die met een dergelijke analyse bepaald worden, zijn beperkt door de noodzaak de vorm te vertalen naar een gerasterde vorm. Desondanks bleken de waarden voldoende voor een breed scala aan toepassingen en maakten ze het mogelijk dynamische processen, zoals zelfassemblage en stalk- en porievorming te volgen en vergelijkbare structuren te analyseren.

Het programma is in principe klaar om te gebruiken in toepassingen. Echter, het zou goed zijn om de computationele effectiviteit te optimaliseren, net als een verfijning van de manier waarop de lokale kromming wordt gevisualiseerd. In het bijzonder zou een methode waarbij de kromming wordt geprojecteerd op de atomen of een iso-surface van het aggregaat de presentatie zeer verbeteren. Maar zelfs in zijn huidige staat kan van het programma verwacht worden dat het het detecteren van morfologische eigenschappen zeer vergemakkelijkt, vooral wanneer een groot aantal simulaties geanalyseerd moet worden. In simulaties waarbij men slechts geïnteresseerd is in een gebeurtenis die gepaard gaat met een

verandering in morfologie (bijvoorbeeld zelfassemblage, het sluiten van een porie of het scheuren van een membraan), kan computertijd bespaard worden door een script te schrijven dat de outputcoördinaten op reguliere intervallen volgt en de simulatie stopt wanneer de gebeurtenis plaatsvindt. Op deze manier kunnen grote aantallen simulaties automatisch gedraaid en geanalyseerd worden.

Los van het faciliteren en automatiseren van andere taken is morfologische analyse een interessante optie voor het beschrijven van moleculaire aggregaten op zich. Doordat de bereikbare systeemgrootte gestaag groeit, valt te verwachten dat het beschrijven van het gedrag op grote schaal steeds belangrijker wordt in de analyse van computersimulaties. Omdat het moleculaire detail nog beschikbaar is in de simulaties, kan de geïmplementeerde bepaling van lokale kromming gebruikt worden om microscopische eigenschappen, zoals de structuur van lipiden, (gedeeltelijk) scheiden van lipide mengsels of het plaatsen van peptiden in lipide aggregaten, te verbinden met de macroscopische lokale kromming.

Ten slotte, op een ander onderzoeksgebied, laten we zien dat het mogelijk is om het veel gebruikte SPC water model te bundelen door restraining-potentialen te gebruiken (Hoofdstuk 6). De verhoogde dichtheid als resultaat hiervan kan gecompenseerd worden door het verhogen van de afstoting tussen de water moleculen.

Twee modellen waarin het telkens vier water moleculen gebundeld waren (zoals nodig voor het beoogde gebruik in multiscaling simulaties) werden gepresenteerd, die voornamelijk verschillen in de stijfheid van de bundels. In beide modellen beïnvloedt de bundeling vooral de structuur en dynamica van water, maar behoudt het de interacties met kleine moleculen, zoals blijkt uit de vrije energieën van hydratatie. Echter, voorbeeldtoepassingen met biomoleculaire systemen laten zien dat een te sterke bundeling kan leiden tot artefacten doordat watermoleculen te diep doordringen in de biomoleculen. We kunnen dus voorspellen dat het model dat een minimale bundelingssterkte gebruikt, juist sterk genoeg om de bundels compact genoeg te houden voor de multiscaling simulaties, het beste zal werken, ook al zal de uiteindelijke parametrisering van de water bundels moeten wachten totdat de multiscaling algoritmes voldoende zijn ontwikkeld.