

Министерство образования и науки Российской Федерации
Московский физико-технический институт
(Государственный университет)
Факультет общей и прикладной физики
Кафедра биофизики

Пинина Юлия Михайловна

**Изучение взаимодействия
мембранных белков и липидов**

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Научный руководитель:
к.ф.-м.н. Гущин И.Ю.

Долгопрудный 2017

Содержание

1 Введение	3
2 Литературный обзор	4
2.1 Мембранные белки	5
2.2 Липиды	6
2.2.1 Архейные и бактериальные липиды	6
2.2.2 Моноглицерид	8
2.3 Взаимодействие мембранных белков и липидов	10
2.4 Моделирование белок-липидных взаимодействий в мембране	12
2.5 Бактериородопсин	16
3 Материалы и методы	19
3.1 Молекулярная динамика	19
3.2 Начальные структуры	20
3.2.1 Белок	20
3.2.2 Мембранные системы	21
3.3 Параметры моделирования	22
3.4 Предварительные моделирования	24
3.5 Программные средства и анализ	24
4 Результаты и обсуждение	26
4.1 Предварительные моделирования	26
4.2 Основные результаты	26

1 Введение

Мембранные белки играют ключевую роль во многих клеточных процессах и занимают около трети кодирующей части генома. В силу своего расположения они постоянно взаимодействуют с окружающими липидами мембранного бислоя. Липиды регулируют как их расположение и активность, так и межбелковое взаимодействие. В свою очередь, белки оказывают влияние на конформацию и свойства липидов.

Бактериородопсин - интегральный мембранный белок, осуществляющий перенос протона через бислой [1]. Впервые бактериородопсин был открыт у архей, мембранных которых имеют некоторую специфичность: вместо обычных жирных кислот гидрофобные части их липидов состоят из изопреновых групп и являются разветвленными. Благодаря таким метильным «ответвлением» мембранны становятся очень прочными, но при этом сохраняют гибкость. Это влияет и на характер взаимодействия с белком.

В данной работе будет проанализировано взаимодействие бактериородопсина с разветвленными и неразветвленными липидами при моделировании методом молекулярной динамики и проведено сравнение с экспериментальными данными.

2 Литературный обзор

Клетка – основной строительный блок всех организмов – отделена от окружающей среды клеточной мембраной, которая обладает не только барьерной, но также и транспортной, механической, рецепторной, ферментативной и другими функциями.

Такое разнообразие обусловлено строением. Мембрана главным образом состоит из трех классов липидов (фосфолипиды, гликолипиды и холестерол) и мембранных белков. Липиды при этом формируют бислой: их углеводородные «хвосты» образуют внутреннюю гидрофобную часть мембраны, а гидрофильные полярные головы обращены в сторону воды. Мембранные белки могут быть встроены в бислой только на одной стороне (интегральные monotопические), пронизывать мембрану насквозь (интегральные политопические, или трансмембранные) или быть связанны с бислоем, не встраиваясь в него (периферические), см. Рис. 1.

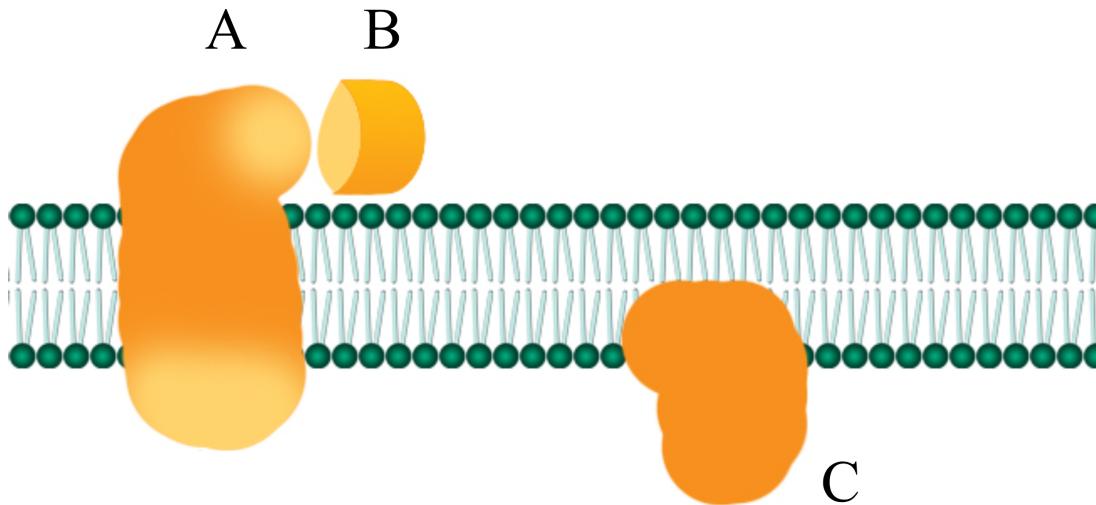


Рис. 1: Типы мембранных белков: А) трансмембранный; В) периферийный; с) интегральный monotопический.

Далее рассмотрим потробнее основные компоненты мембраны и их взаимодействие. Под мембранными белками будут иметься в виду только трансмембранные белки.

2.1 Мембранные белки

Большое количество функций клеточных мембран во многом обеспечивается разнообразием функций мембранных белков: различные белки участвуют в транспорте ионов и воды, передаче сигналов, ферментативных процессах, межклеточном узнавании и др. Важность этих процессов для клеточной жизнедеятельности в сочетании с фактом, что около 25% белков являются мембранными [2], делает мембранные белки объектом огромного числа исследований.

Основополагающим этапом изучения белков является решение их пространственной структуры. Классический метод, применяемый для этого, – кристаллизация белков и рентгеноструктурный анализ кристаллических структур. Однако, если в случае растворимых белков этот метод не представляет сложности, то универсальных методов кристаллизации мембранных белков нет. Это связано с тем, что вне своего естественного окружения – липидного бислоя – мембранные белки нестабильны. Нестабильность можно избежать воспроизведением свойств исходно окружающих белок липидов. Поэтому для солюбилизации мембранных белков применяют детергенты – амфифильные молекулы, которые, замещая липиды бислоя и связываясь с гидрофобной частью белка, разрушают мембрану, сохраняя при этом нативное состояние белка. Выбор детергента представляет собой отдельную трудность: разные детергенты по-разному действуют на одни и те же белки, и теоретически предсказать взаимодействие между детергентами, липидами и белком нельзя. Более того, кристаллизация солюбилизированного мембранного белка происходит вместе с детергентом, что также накладывает условия на его выбор.

На данный момент 40% кристаллов мембранных белков получены при кристаллизации в липидной кубической фазе (кристаллизация *in meso*, [3]) – особой трехмерной структуре, которые образуют некоторые липиды при определенных температурах и концентрациях. В липидной мезофазе белки способны свободно передвигаться по двумерной мембранный поверхности и таким образом добираться до формирующегося кристалла, не покидая при этом липидный бислой.

Трудности кристаллизации мембранных белков объясняют малое количество решенных структур высокого разрешения по сравнению с растворимыми белками. Тем

не менее, число решаемых с высоким разрешением структур мембранных белков растет с экспоненциальной зависимостью [4], и к 2020 году должно достигнуть $\sim 2,800$ единиц.

Знание молекулярной структуры необходимо для понимания того, как белки функционируют, так как именно молекулярная структура определяет взаимодействие с другими молекулами. А зная ее и используя компьютерные методы, можно подбирать молекулы, которые будут целенаправлено взаимодействовать с определенными белками. Таким образом можно удешевить и ускорить разработку лекарственных препаратов – более 60% лекарств используют именно мембранные белки в качестве мишени [5].

2.2 Липиды

Липиды – следующий важнейший компонент, составляющий основу мембраны.

2.2.1 Архейные и бактериальные липиды

Несмотря на то, что археи и бактерии могут казаться похожими, они относятся к разным доменам живым организмов, и имеют большое число отличий. Одно из них – строение клеточной мембраны.

Археи, большинство которых обитают в экстремальных условиях, губительных для других организмов – например, большие температуры, низкий или высокий pH, высокие концентрации ионов – имеют мембранные липиды в которых обладают следующими характерными свойствами [6, 7]:

1. Связь липидных остатков с глицерином является эфирной, тогда как в бактериях в основном сложноэфирной. Эфирная связь более прочная, чем сложноэфирная, что позволяет археям выживать в экстремальных условиях.

2. Углеводородные остатки архей связаны с *sn*-2,3 атомами углерода глицерина (L-глицерин), а не с *sn*-1,2, как в случае остальных организмов (D-глицерин). Это связано с тем, что для синтеза липидов в археях используются другие ферменты, нежели в бактериях и эукариотах.

3. Основу углеводородных «хвостов» составляют изопреновые группы, поэтому архейные липиды разветвленные и насыщенные, в отличие от неразветвленных и зачастую ненасыщенных бактериальных. Такое строение также расширяет диапазон температур, подходящих для жизнедеятельности архей.

4. Архейные липиды могут быть как монополярными (одна полярная голова), формирующими монослои, так и биполярными (две полярные головы, фактически два соединившихся «хвостами» монополярных липида), формирующими монослои.

Сравнение строения бактериальных и архейных липидов представлено на Рис. 2

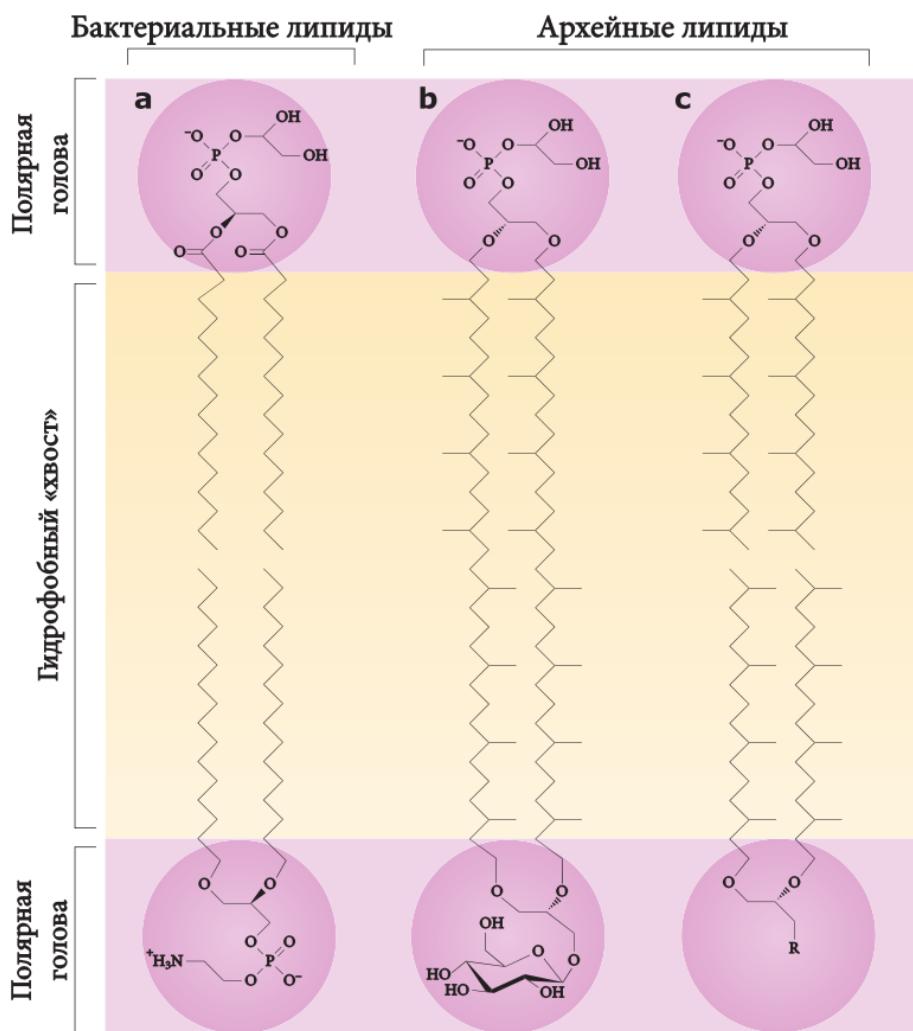


Рис. 2: Адаптировано из [7]. Строение бактериальных и архейных липидов: а) бактериальный липид; б) архейный биполярный липид; в) архейный монополярный липид.

2.2.2 Монолеин

Монолеин (МО) – 1-моно [цис-9-октадециеноил]-рац-глицерол – представляет собой углеводородный остаток C₁₈ с двойной связью между C₉ и C₁₀, присоединенный к глицерину сложноэфирной связью (Рис. 3). Две оставшиеся гидроксильные группы глицерина составляют полярную часть и могут участвовать в формировании водородных связей. Таким образом, монолеин – амфифильная молекула с гидрофильно-липофильным балансом (HLB) 3.8.

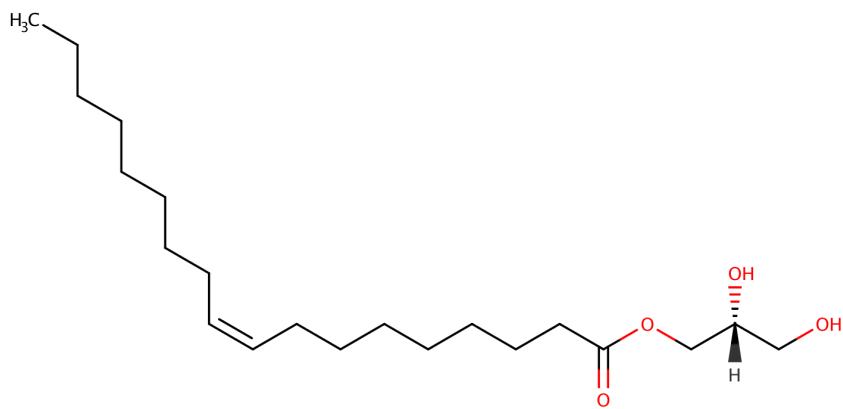


Рис. 3: Строение молекулы монолеина

Развернутый обзор свойств и применения МО можно найти в [8].

Интерес к монолеину неуклонно растет последние десятилетия, что отражено в постоянном росте количества научных публикаций и промышленных патентов. Это, на первый взгляд, может показаться странным из-за простого строения МО, но объясняется амфифильными свойствами, благодаря которым МО способен формировать разнообразные жидкокристаллические структуры. Варьируя температуру и состав смеси, получают термотропные и лиотропные фазы, соответственно.

Как и большинство известных амфифильных молекул, в воде МО формирует одномерные, двумерные и трехмерные структуры, что отвечает ламеллярной, гексагональной и биконтинуальной кубическим фазам соответственно. Другие фазы, как правило, формируются в присутствие дополнительных компонентов и большей энергии (Рис. 4)

С учетом многообразия лиотропных фаз МО, крайне важно уметь заранее пред-

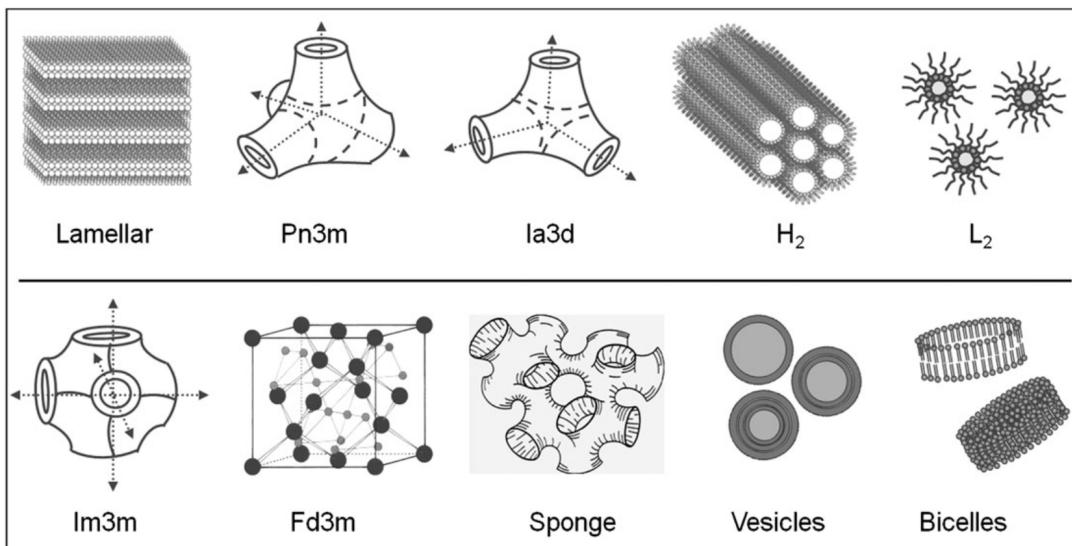


Рис. 4: Фазы, формируемые МО. В присутствии воды (верхний ряд): ламеллярная, биконтинальные кубические фазы Pn3m и Ia3d, гексагональная H₂, жидккая изотропная (инверсная мицеллярная) L₂; дополнительные фазы, в присутствие воды и других компонентов, например, (глико)липидов, детергентов, солей (нижний ряд): биконтинальная кубическая фаза Im3m, мицеллярная кубическая Fd3m, губчатая, везикулы, бицеллы.

сказывать, какая фаза будет сформирована при определенных условиях. Теоретически это возможно, так как система находится в той или иной фазе, исходя из принципа минимизации свободной энергии. Но огромное количество параметров, от которых зависит свободная энергия, делает такое теоретическое предсказание крайне сложным даже для самых простых молекул. Это одна из причин, по которой фазовые диаграммы, отображающие состояние системы в зависимости от температуры, давления и дополнительных параметров, до сегодняшнего дня строятся экспериментально.

МО - один из самых широко исследованных липидов с точки зрения фазового поведения, как теоретически, так и экспериментально. Одна из последних фазовых диаграмм МО представлена на (Рис. 5, [9])

В настоящее время МО находит широкое применение в различных областях: от фармацевтики, пищевой и косметической промышленности и агрономии до кристаллизации белков. Причины такой «популярности» – детальная изученность фазового

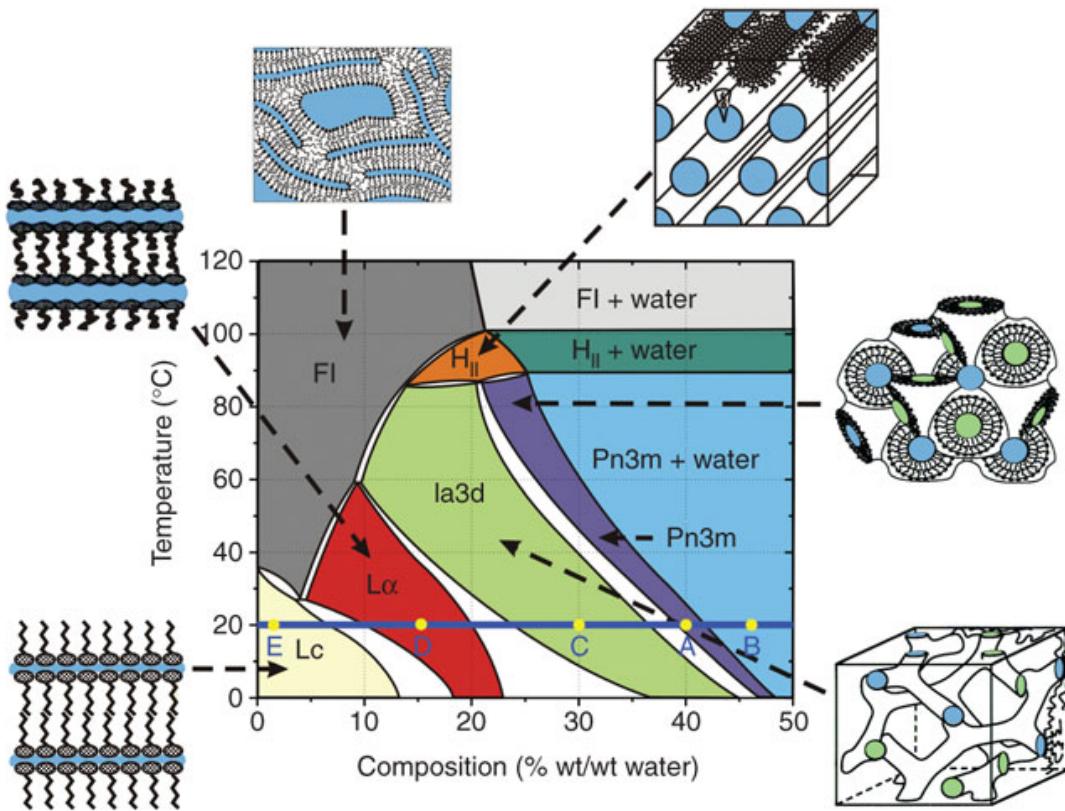


Рис. 5: Температурно-композиционная фазовая диаграмма МО. Цветные участки в графическом представлении фаз отвечают воде.

поведения и химических свойств, а также биосовместимость. Главным образом, МО используется в виде димперсных наночастиц (кубосом и гексосои) для доставки лекарственных средств. Среди других применений - биосенсоры, эмульгаторы, усилители растворимости и т.д. Лиотропные фазы, включая биконтигуальную кубическую фазу, имеют множество приложений в биотехнологии, медицине, материаловедении и химических науках, а также индустрии.

2.3 Взаимодействие мембранных белков и липидов

Для полного понимания процессов, происходящих в мембране важно разобраться, как мембранные белки взаимодействуют с бислоем.

Большинство полученных структур мембранных белков не содержат липидного окружения, и в лучшем случае можно распознать только несколько самых близких молекул (или частей) липидов или детергентов. Однако, многие исследования

свидетельствуют о том, что липиды играют активную роль в функциональных и структурных изменения в мембранных белках.

Примером влияния липидов на функциональность белков является решенные в структуре цитохром с-оксидазы молекулы кардиолипина, удаление которых ведет к потере ферментативной активности [10]. Также показано, что наличие свалена и фосфатидил-глицерофосфата необходимо для нормального протекания фотоцикла бактриородопсина [11].

Верно и обратное: белки в свою очередь тоже оказывают влияние на бислой, среди проявлений которого – специфичное связывание липидных молекул с определенными сайтами интегральных белков, образование оболочки из липидов вокруг белка, деформация бислоя и др.

По аналогии с растворимыми белками, образующими вокруг своей поверхности устойчивую оболочку (1-2 слоя) молекул воды, мембранные белки окружены оболочкой из молекул липидов. Оболочка состоит из двух частей: первый слой из липидов ограниченной мобильности, непосредственно взаимодействующих с белком, и остальные молекулы, по подвижности более сходные со свободными липидами. Молекулы, составляющие первый слой такой оболочки, называют аннулярными (от *annulus* – кольцо). Большинство аннулярных липидов не задерживаются в одном положении, они уходят дальше от белка, а их место занимают другие; скорость такого обмена составляет $1-2 \times 10^7$ с^{-1} при 37 °C [12]. Такая подвижность свидетельствует о том, что положения вблизи белка не дают какого-то значительного выигрыша в энергии, и подвижность липидов ограничиваются слабыми Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями, водородными связями и электростатикой. Это объясняет и то, что липиды редко попадают в кристаллографические структуры.

Выделяют также и неаннулярные липиды, которые, в отличие от аннулярных специфично связываются с определенными участками на поверхности белка. К примеру, такими являются отрицательно заряженные липиды, решенные в структуре гомотетрамера калиевого канала KcsA [13]. Более того, показано, что в отсутствие таких липидов нормальное функционирование канала прекращается.

Другим примером является исследования механочувствительных каналов MscS

в *E. coli* [14]. Данные рентгеновской дифракции и компьютерного моделирования говорят о наличии связанных молекул липида внутри «карманов», сформированных трансмембранными спиралями (Рис. 6). При этом количество таких липидов уменьшается с открытием канала. Предполагается, что увеличение натяжения в мемbrane вызывает перестройки липидов в «карманах», это, в свою очередь, дестабилизирует белок и содействует открытию канала. Кроме того, этот пример иллюстрирует значительную деформацию бислоя в окрестности мембранныго белка.

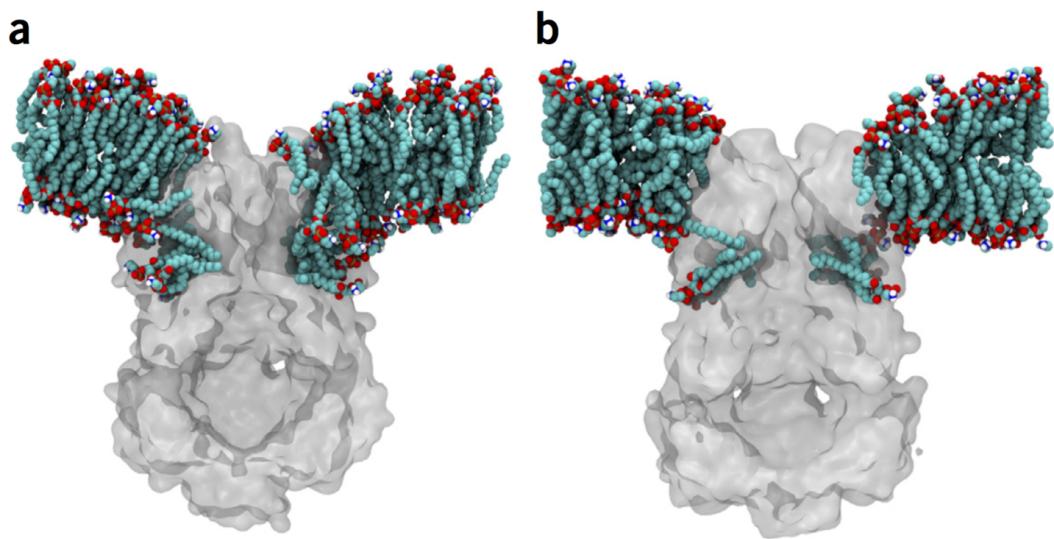


Рис. 6: [14] Срезы мембраны с механочувствительным каналом MscS. а) закрытая конформация; б) открытая конформация.

Механизмы перечисленных выше явлений, однако, полностью пока не объяснены. Эти примеры демонстрируют лишь частные случаи липид-белкового взаимодействия, все многообразие которого только предстоит изучить.

2.4 Моделирование белок-липидных взаимодействий в мембране

В настоящее время ключевую роль в изучении взаимодействия мембранных белков и липидов играет молекулярная динамика. Этот метод позволяет наблюдать за белком в его естественном окружении или модельном бислое. Важным является то, что метод молекулярной динамики дает возможность воссоздать гомогенный бислой

и исследовать неспецифичные по отношению к липидам, в то время как бислой даже самого простого живого организма – сложная гетерогенная система.

Один из примеров – исследования липидных взаимодействий с аквапорином [15, 16]. Были проведены полноатомные [15] и смешанные [16] моделирования по 0.1 мкс и сравнение результатов с данными электронной микроскопии. Были рассчитаны плотности липидов в плоскостях, параллельных мембране, на разных уровнях z , соответствующих различным функциональным группам липидов (Рис. 7). На Рис. 8 приведено сравнение положений фосфатных групп из моделирования и из эксперимента, и видно, что соответствие, хотя и не полное, но есть.

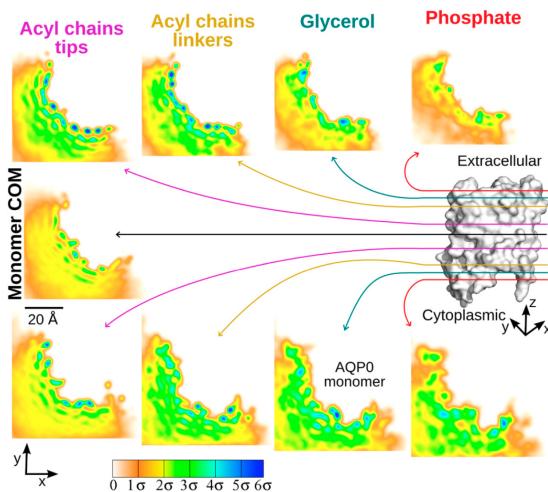


Рис. 7: [15] Плотности липидов DMPC вокруг мономера AQP0. Проекции взяты на высоте z центров масс обозначенных липидных групп. Цветом показаны проекции плотностей на плоскости.

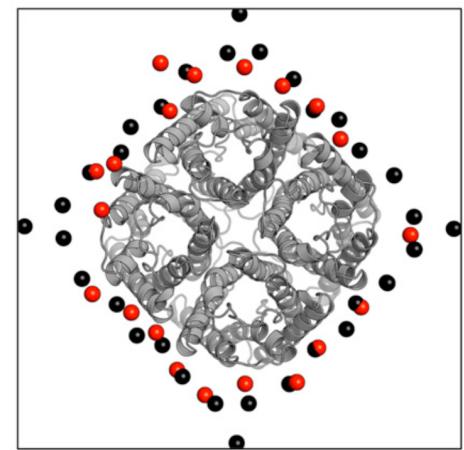


Рис. 8: [16] Кадр крупнозернистого моделирования AQP0 фосфатами (крачные сферы) в радиусе 6 Å от белка. Экспериментальные фосфаты показаны черными сферами.

В работе Y. Sonntag et al. [17] исследуется кальциевая АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA). Поднимается вопрос, может ли детергент влиять на мембранные липиды и структуру белка. На Рис. 9 для белковых конформаций E2 и E2P сравнивается распределение плотностей в бислой, полученных рентгеновской дифракцией (а), и средние положения атомов фосфора полученные в результате двух

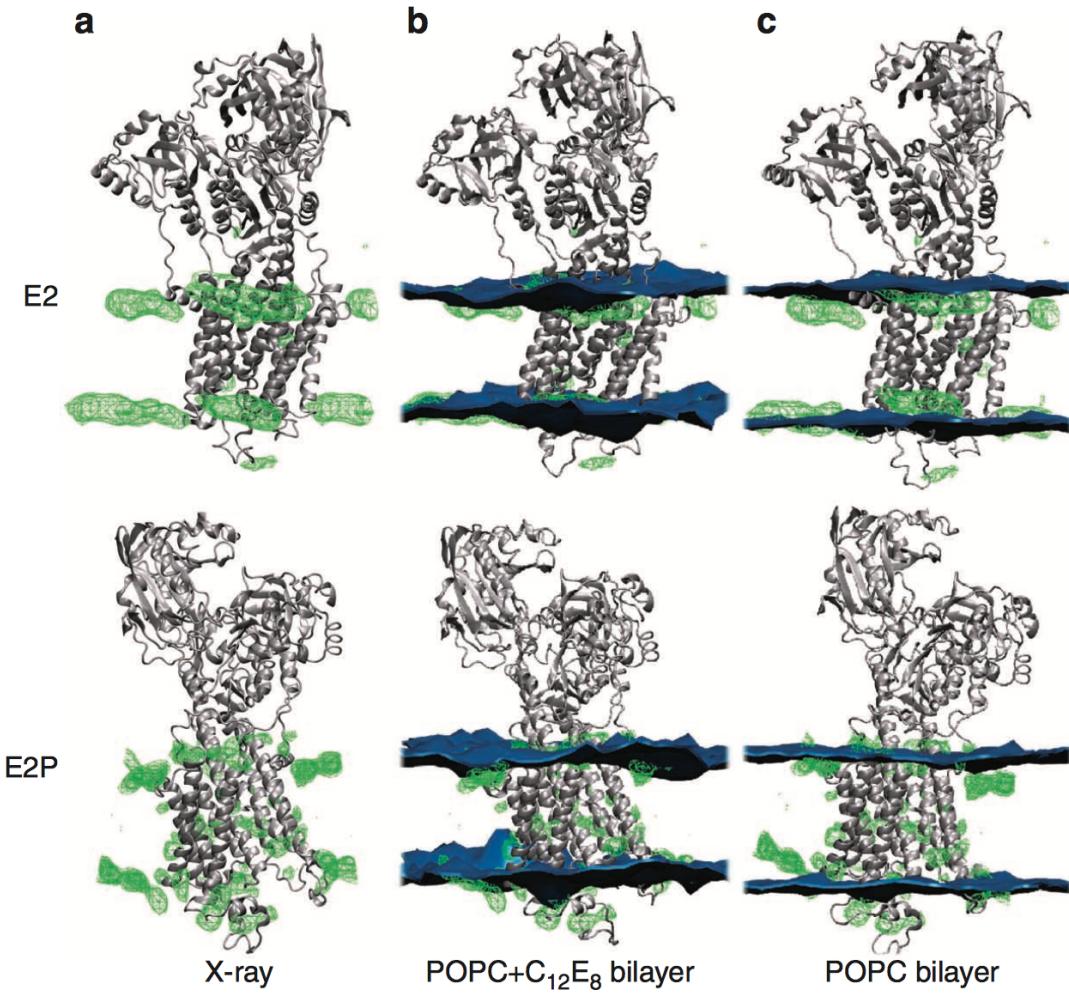


Рис. 9: [17] Сравнение липидных плотностей, экспериментальных (а), из моделирования в смеси из POPC и детергента C₁₂E₈ (б) и моделирования в чистом POPC (с). Структура белка в (а) – экспериментальная, в (б,с) – усредненная по траектории.

моделирований по 50 нс. Одно моделирование проводилось для мембранны из POPC и детергента C₁₂E₈, воспроизводящего кристаллизационную среду, а другое для бислоя из чистого POPC, передающего нативное окружение белка. Оказалось, что моделирование в смеси с детергентом, хорошо соотносится с экспериментом: совпадает и толщина мембранны, и ориентация белка. При этом несоответствия с моделированием в чистом POPC очевидны, что говорит о влиянии детергента на белок и липиды.

В этой же работе изучался структурный механизм несоответствий между гидрофобной толщиной SERCA (21-24 Å) окружающего бислоя, в котором проявляется максимальная активность (~30 Å); такое явление наблюдается и для многих других

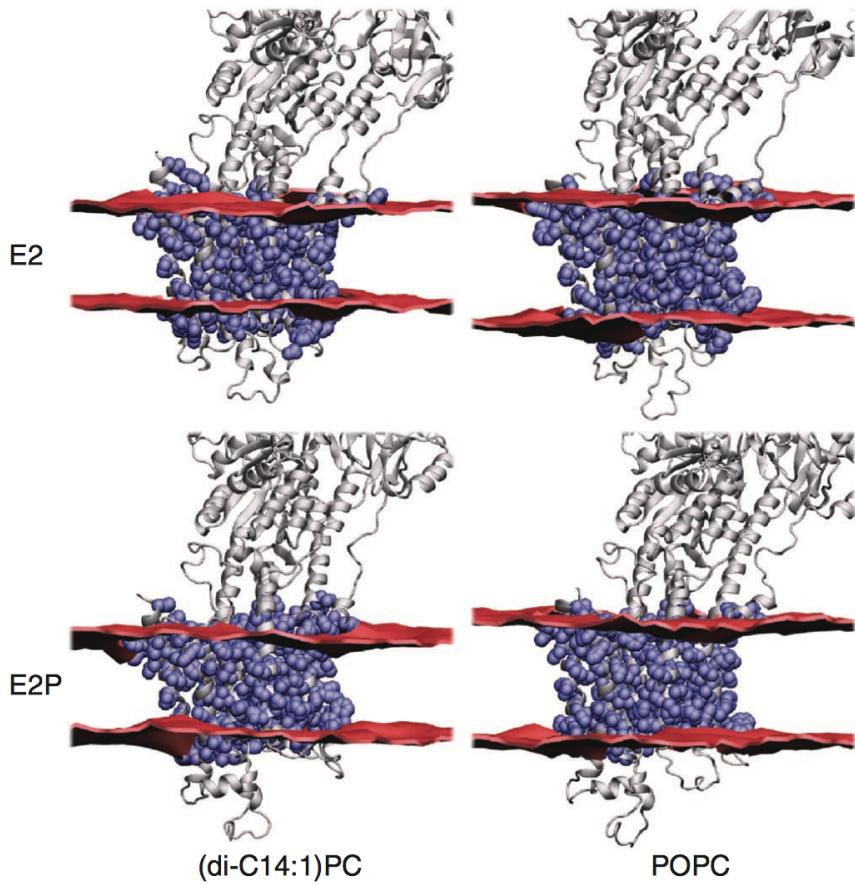


Рис. 10: [17] Средние структуры SERCA конформаций E2 и E2P в бислоях (di-C14:1)PC и POPC. Синими сферами показаны гидрофобные остатки, красным – средние положения карбонильных атомов кислорода.

мембранных белков. Для этого был проведен ряд моделирований в односоставных бислоях из (di-C14:1)PC, POPC, SGPC, имеющих гидрофобную толщину 23, 29 и 32 Å, соответственно. Выяснилось, что вблизи белка бислой локально деформируется таким образом, чтобы избежать гидрофобно/гидрофильных контактов, а боковые группы белка в свою очередь поворачиваются, адаптируясь к ближайшим липидам. Кроме того, оказалось, что оптимальное окружение для функционирования белка создает POPC. Это обеспечивается большей гибкостью липидов за счет длины «хвостов» и полному соответству гидрофобных и гидрофильных участков. Напротив, в системе с (di-C14:1)PC десять гидрофобных аминокислотных отстатков оказываются в контакте с полярными группами липидов, как следствие слишком короткой длины «хвостов» (Рис. 10)

2.5 Бактериородопсин

Бактериородопсин (БР) – активируемый светом протонный насос – был впервые открыт как основной компонент так называемой пурпурной мембраны [18]. Благодаря своей распространенности и простоте очистки, БР может быть выработан в больших количествах, что делает его модельным белком, широко применяемым для разработки методов в биофизике. Именно для БР методом электронной микроскопии было впервые получено разрешение 7 Å, в дальнейшем улучшенное до немногим более атомарного.

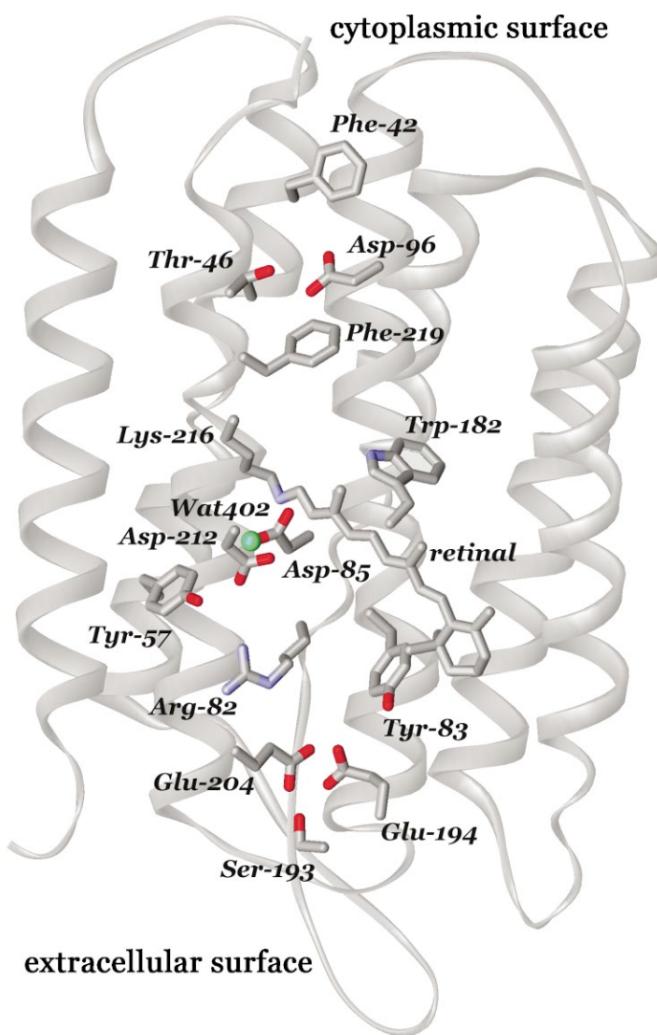


Рис. 11: Структура бактериородопсина, код PDB - 1C3W, [1]. Показана третичная структура, функциональные остатки, ретиналь и молекула воды *Wat402*.

Несмотря на то что БР не стал первым мембранным белком, кристаллографи-

ческая структура которого была определена, эксперименты с ним дали толчок для развития многих нетрадиционных техник кристаллизации, в том числе кристаллизации в липидной кубической фазе и из везикул. БР использовался для разработки методик кристаллизации в мезофазе из нанодисков и амфиполей [19, 20]. БР исследовался методом атомной силовой микроскопии, при этом простая АСМ подвертила упаковку БР в пурпурных мембранах [21], а высокоскоростная показала движение БР в мемbrane и его гексагональную упаковку тримерами [22]. Наконец, БР и пурпурные мембранны широко изучаются *in silico*.

Подробный обзор структурных и функциональных исследований БР можно найти в [1, 23]. Структура приведена на Рис. 11. Мономер БР состоит из 7 α -спиралей, соединенными короткими межспиральными участками и окружающими молекулу кофактора ретиналя, соединенного с остатком лизина (Lys216). Ретиналь принимает непосредственное участие в транспорте протона.

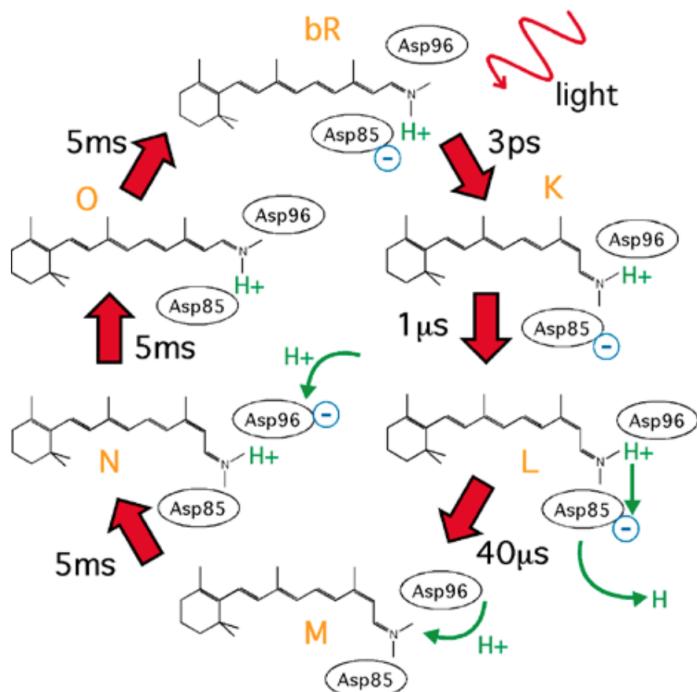


Рис. 12: Фотоцикл бактериоропсина.

Механизм переноса протона состоит в следующем (Рис. 12). В основном состоянии протон локализован в соединяющем ретиналь с лизином шифровом основании, к которому водородной связью присединена молекула воды Wat402. Wat402 скордин-

нирована также аминокислотными остатками Asp85 и Asp212. При этом объем, где находится Wat402 и еще две молекулы воды ограничен ретиналом с одной стороны и остатком Arg82 с другой. Поглощение фотона приводит к изомеризации ретиналя: он переходит из полностью-транс в 13-цис форму. В такой конформации протонированное состояние шиффова основания энергетически не выгодно, и остаток Asp85 становится акцептором протона.

Далее, протон должен быть перенесен к выходному участку из остатков Glu194 и Glu204, что в основном состоянии невозможно из-за Arg82. Поэтому в M-состоянии этот остаток отворачивается от шиффова основания и протон уходит на Glu194/204, замещая предыдущий протон, который уходит в раствор.

На следующем шаге ретиналь вновь протонируется от Asp96, входного участка, который в свою очередь должен получить новый протон из цитоплазмы (см. механизмы в [22, 24, 25])

Хотя общие принципы фотоцикла БР давно понятны, но детали механизмов переноса, в частности конформационные перестройки, еще только предстоит прояснить.

БР – популярный модельный белок для изучения многих процессов, связанных с мембранными белками. В данной работе именно на примере БР исследуется взаимодействие мембранных белков и липидов. Этому способствовал и тот факт, что на сегодняшний день доступны структуры БР, выделенного как их родных для него клеток, так и из клеток *E. coli* [26], что позволяет в полной мере сравнить результаты, полученные методом молекулярной динамики, с экспериментальными данными.

3 Материалы и методы

3.1 Молекулярная динамика

В основе метода молекулярной динамики лежит описание движения частиц с помощью классической механики. При этом взаимодействия всех атомов системы задаются эмпирически подобранный энергетической функцией, дифференцирование которой позволяет вычислить силы, действующие на все атомы системы. Численным интегрированием уравнений Ньютона получают временные траектории движения частиц, анализ которых позволяет расширить информацию о функционировании систем [27].

Для эффективного применения метода молекулярной динамики важно, чтобы взаимодействия между атомами учитывались максимально точно. В общем случае потенциальная энергия взаимодействующих атомов системы выглядит следующим образом:

$$\begin{aligned} V(r) = & \sum_{bonds} k_b(b - b_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta(\theta - \theta_0)^2 \\ & + \sum_{dihedrals} k_\phi(1 + \cos(n\phi - \phi_0)) + \sum_{impropers} k_\psi(\psi - \psi_0)^2 \\ & + \sum_{\substack{non-bonded \\ pairs (i,j)}} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\substack{non-bonded \\ pairs (i,j)}} \frac{q_i q_j}{\epsilon_d r_{ij}} \end{aligned}$$

Потенциальная энергия от координат всех атомов r , расстояний между связанными атомами b и несвязанными атомами r_{ij} , плоских углов θ и двугранных углов ϕ и ψ . k_b , k_θ , k_ϕ , k_ψ – параметры, описывающие поведение ковалентносвязанных атомов, b_0 , θ_0 , ϕ_0 , ψ_0 – равновесные значения длины ковалентной связи b , плоских углов θ , двугранных углов ϕ и ψ , n – кратность. Последние два члена суммы отвечают за потенциал Леннарда-Джонса и кулоновское взаимодействие, где ϵ_{ij} – глубина потенциальной ямы, σ_{ij} – эффективный диаметр частицы, q_i и q_j – заряды на атомах и ϵ_d – константа кулоновского потенциала. Выбор параметров основан на экспериментальных данных и квантовомеханических вычислениях.

В данный момент существует довольно большое многообразие силовых полей: CHARMM [28], AMBER [29], GROMOS [30] и другие. Каждое из них создавалось

для определенных целей и в рамках этих целей хорошо совпадает с экспериментом, при этом что набор параметров довольно сильно отличается. Важно, что всегда возможность вручную изменять параметры выбранного силового поля.

Помимо правдоподобности параметров силового поля, для применения метода молекулярной динамики необходима правильная топология системы, которая содержит информацию о том, между какими атомами должны действовать ковалентные взаимодействия, а также о постоянных атрибутах каждой частицы (тип, масса, заряд).

Важной характеристикой траекторий, получаемых методом молекулярной динамики, является длина. В настоящий момент для моделирования мембранных систем доступны времена порядка ~ 1 мкс.

Для расчета траекторий методом молекулярной динамики использовался программный пакет GROMACS [31, 32]. GROMACS - один из самых быстрых и популярных программных пакетов. В нем эффективно используются алгоритмы параллелизации, расчет может происходить как на ЦПУ, так и на графическом процессоре.

3.2 Начальные структуры

Для моделирования методом молекулярной динамики были подготовлены старевые системы: все структуры атомарные, включают мембранный белок, липиды, молекулы ионов и воды.

3.2.1 Белок

В качестве модельного белка в работе используется бактериородопсин. Была выбрана структура с кодом PDB 1QHJ. При этом к остатку Lys216 был ковалентно присоединен ретиналь, новый остаток был переименован в Lyr216. Параметры для ретиналя были взяты и адаптированы для CHARMM36 из приложения к S. Zhu et al., 2013 [33].

Ретиналь находится в протонированном состоянии, также протонированы остатки Glu9, Asp96, Asp115, Glu204.

За исключением остатков с номерами 5-7, 32-37, 156-163, 230-232, остав белка был закреплен путем приложения изотропной силы с постоянной константой 250 кДж·моль⁻¹·нм⁻¹. Гармонический потенциал, удерживающий *i*-й атом в положении \mathbf{R}_i , имеет вид $V_{pr}(\mathbf{r}_i) = \frac{1}{2}k_{pr}|\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_i|^2$.

3.2.2 Мембранные системы

Следующим шагом было построение полных мембранных систем. В качестве модельных были выбраны следующие липиды: 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолил (POPC, Рис. 13), 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолил (DPhPC, Рис. 14) иmonoолеин (Рис. 3). POPC выступает в качестве модельного бактериального липида, DPhPC – архейного, а monoолеин – как один из самых распространенных детергентов. Для каждого из перечисленных липидов была построена отдельная мембранный система.

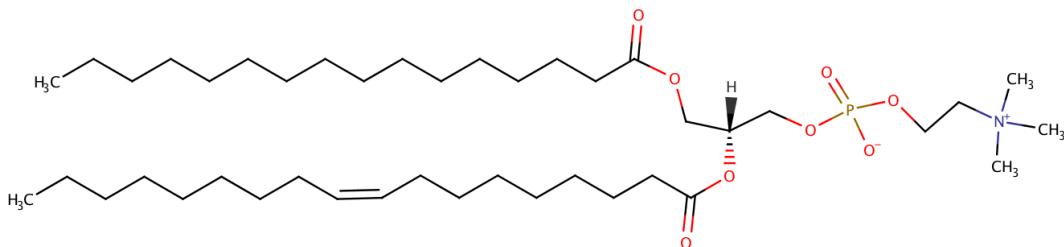


Рис. 13: Строение молекулы POPC.

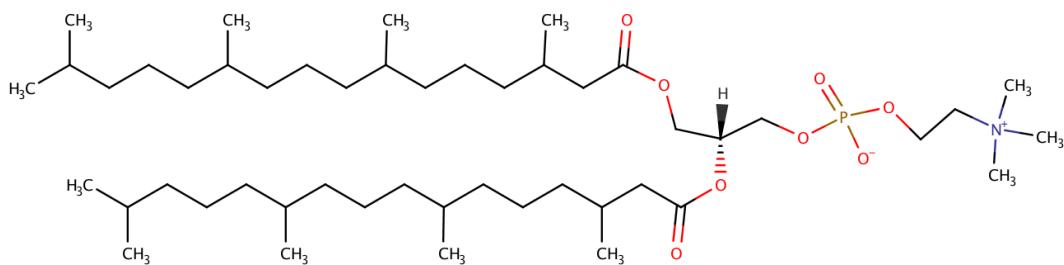


Рис. 14: Строение молекулы DPhPC.

Для вставки бактериородопсина в мембрану использовался сервер CHARMM-GUI [34,35]. Ориентация белка в мембране была выбрана в соответствии с базой дан-

ных ОРМ [36]. CHARMM-GUI позволяет выбрать липиды для бислоя из его базы, при этом POPC и DPhPC (под названием PHPC) в ней присутствует, а моноолеин нет. Поэтому для системы с бислоем из моноолеина белок был первоначально вставлен в 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолил (DOPC) (Рис. 15). DOPC состоит из двух олеиловых «хвостов» и полярной головы. Для его преобразования в моноолеин из структуры были удалены все атомы, кроме атомов одного «хвоста» и глицерина. Границные атомы (Р и О) были заменены на водороды, связи с ними уравновесились на этапе минимизации энергии. Были подготовлены два стереоизомера моноолеина с учетом хиральности среднего атома углерода в глицерине.

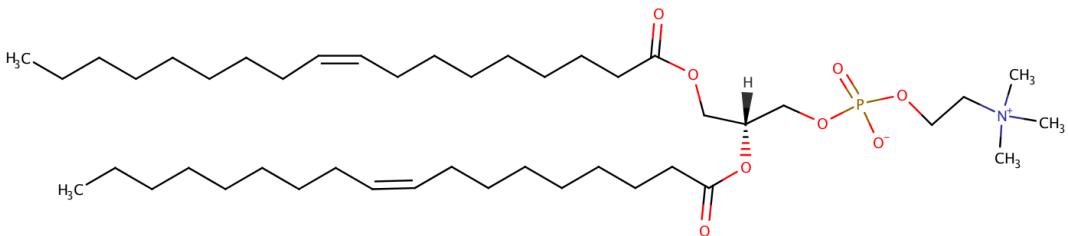


Рис. 15: Строение молекулы DOPC.

Каждая из систем содержит 256 молекул липидов, по 128 в каждом монослое. Количество молекул воды определялось исходя их гидратационного числа для липидов: в случае POPC и PHPC оно равно 40, в случае моноолеина – 30, ввиду меньшего размера молекулы. Следовательно, в системах с POPC и PHPC по 12800 молекул воды, в системе с моноолеином – 8960. Используемая модель воды – TIP3P [37]. Во всех системах была выбрана одинаковая суммарная концентрация ионов Na^+ и Cl^- , рассчитанная по количеству воды и равная 1 М. Сводная информация по составу систем представлена в табл. 1.

С использованием интерфейса CHARMM-GUI был выбран гексанольный тип элементарной ячейки ($a = b \neq c$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$).

3.3 Параметры моделирования

Моделирование проводилось с помощью программного пакета GROMACS, используемое силовое поле – CHARMM36.

Использовались периодичные во всех направлениях граничные условия, что означает бесконечное повторение элементарной ячейки во все стороны. Это наиболее соответствует реальности, в отличие от жестких и подвижных граничных условий.

Расчет проводился в ансамбле NPT , т.е. постоянными сохранялись число частиц N , давление P и средняя температура системы T . Под температурой системы понимается мгновенная температура \tilde{T} , вычисленная из полной кинетической энергии системы \tilde{E}_{kin} по теореме о равнораспределении:

$$\tilde{E}_{kin} = \frac{3}{2}k_B\tilde{T}$$

Функция термостата заключается в поддержании постоянной средней температуры T , а не мгновенной, что привело бы к сохранению полной кинетической энергии.

Выделяют два основных метода термостатирования: Берендсена [38] и Нозе-Гувера [39, 40]. Алгоритм Берендсена корректирует производную температуры по времени согласно уравнению $\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau_T}$, т.е. отклонения температуры $T - T_0$ экспоненциально убывают с временной постоянной τ_T . Термостат Берендсена подавляет флуктуации кинетической энергии, поэтому не обеспечивает правильный канонический ансамбль. Алгоритм Нозе-Гувера является более точным, и обеспечивает канонический ансамбль за счет стохастической добавки к гамильтониану. Термостат Берендсена эффективен для приведения системы к нужной температуре в начале вычислений или после изменения условий расчета, а Нозе-Гувера – для расчета равновесных систем.

Для поддержания давления используется баростат. Обычно используется баростат Берендсена и Парринелло-Рахмана, которые аналогичны термостатам Берендсена и Нозе-Гувера, соответственно.

На этапе приведения системы к равновесию использовался термостат и баростат Берендсена, а на основном этапе моделирования термостат Нозе-Гувера и баростат Парринелло-Рахмана. Температура поддерживалась равной 303.15 К отдельно для белка, липидов и воды с ионами, константа связывания – 1.0 пс. Давление – 1.0 бар, при этом деформации в плоскости xy происходят независимо от оси z (semiisotropic pressure scaling), объемная сжимаемость – 4.5×10^{-5} бар $^{-1}$, константа связывания – 5.0 пс.

Интегрирование производилось с помощью стандартного интегратора leap-frog [31], с временным шагом интегрирования 2 фс. Список взаимодействующих негравитационных атомов обновлялся каждые 20 шагов. Учитывались только взаимодействия атомов, расстояние между которыми меньше, чем 1.2 нм. Расстояние действия ближнепольных Ван-дер-Ваальсовых сил – 1.2 нм. Для расчёта электростатических взаимодействий использовался метод быстрого суммирования по решётке PME с интервалом 0.1 нм и кубическим приближением. Кадры траектории записывались каждый 12500-й шаг (25 пс).

Кроме того, дополнительно гасится трансляционное движение центров масс групп липиды/белок и вода/ионы с частотой в 100 кадров.

3.4 Предварительные моделирования

Кроме основных моделей, был проведен ряд вспомогательных предварительных моделей, которые можно разделить на две серии:

- Первая часть состоит из двух моделей в модельных архейной (DPhPC) и бактериальной (POPC) мембране. В этом случае использовались стандартные параметры для ретиналя из CHARMM36, а белковый остов был полностью зафиксирован с силовой константой $10000 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{нм}^{-1}$.
- Вторая часть включает моделирования в бислоях из DPhPC, POPE (1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин), POPG (1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфатид-рац-1-глицерин) и смеси из перечисленных липидов и моноолеина. Здесь параметры ретиналя были изменены, а белковый остов не был зафиксирован.

Подробности о составе этих систем приведены в табл. 1.

3.5 Программные средства и анализ

Для получения и анализа траекторий использовался ряд программ из пакета GROMACS:

- `gmx_make_nd` позволяет создавать и изменять index-файлы, т.е. список атомов, составляющих группы, которые должны быть избранно использованы другими программами;
- `gmx_pdb2gmx` генерует файлы с топологией системы, добавляет отсутствующие атомы водорода;
- `gmx_trjconv` конвертирует траекторию различными способами (есть возможность оставить только нужные атомы, изменить периодичность, уменьшить число кадров и др.);
- `gmx_density` рассчитывает плотности выбранных групп вдоль выбранной оси;
- `gmx_genrestr` генерирует файл для с параметрами для удержания атомов в определенном положении;

Основными средствами визуализации были программы VMD [41] и PyMOL [42].

4 Результаты и обсуждение

В начале будут приведены результаты вспомогательных предварительных моделей, затем результаты анализа основных траекторий.

В табл. 1 приведены

Таблица 1: Состав мембранных систем.

Название системы	Липид	Кол-во молекул липида	Кол-во молекул воды	Количество катионов Na^+	Количество анионов Cl^-	Суммарная конц-я ионов, М
J_4100	POPC	256	12800	114	117	1
J_4110	DPhPC	256	12800	14	117	1
J_4120	MO	256	8960	79	82	1

4.1 Предварительные моделирования

Так же, как в разделе 3.4, разделим результаты на две части по сериям моделей:

1. В применяемом силовом поле CHARMM36 присутствуют встроенные параметры для ретиналя, но, как показали предварительные моделирования, они плохо отражают его поведение: за время, меньшее 5 фс (частота вывода) ретиналь принимал неправильную изомеризацию (Рис. 17). Поэтому в последующих моделях параметры были изменены на взятые из приложения к S. Zhu et al., 2013 [33].
2. Снятие гармонического потенциала, удерживающего остав белка в начальном положении,

4.2 Основные результаты

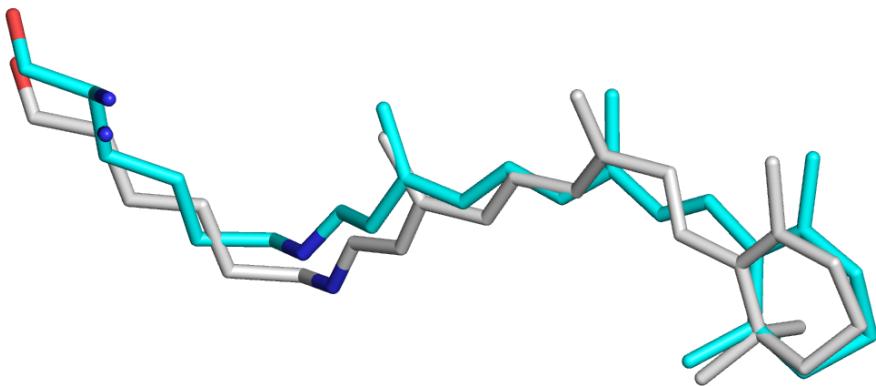


Рис. 16: Сравнение остатков LYR. Серым показан LYR из кадра траектории, для получения которой использовались параметры для ретиналя из CHARMM36, голубым – измененные параметры.

Список литературы

- [1] Lanyi J. K. Bacteriorhodopsin // Annual Review of Physiology. — 2004. — Vol. 66. — P. 665–668. 3, 16, 17
- [2] Stevens T. J., Arkin I. T. Do More Complex Organisms Have a Greater Proportion of Membrane Proteins in Their Genomes? // Proteins. — 2000. — Vol. 39, no. 4. — P. 417–420. 5
- [3] Landau E. M., Rosenbusch J. P. Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1996. — Vol. 93. — P. 14532– 14535. 5
- [4] White S. H. Biophysical dissection of membrane proteins // Nature. — 2009. — Vol. 459. — P. 344–346. 6
- [5] Overington J. P., B. Al-Lazikani, Hopkins A. L. How many drug targets are there? // Nat. Rev. Drug Discov. — 2006. — Vol. 5, no. 12. — P. 993–996. 6
- [6] Patel G. B., Sprott. Archaeal Membrane Lipids // eLS. — 2006. 6

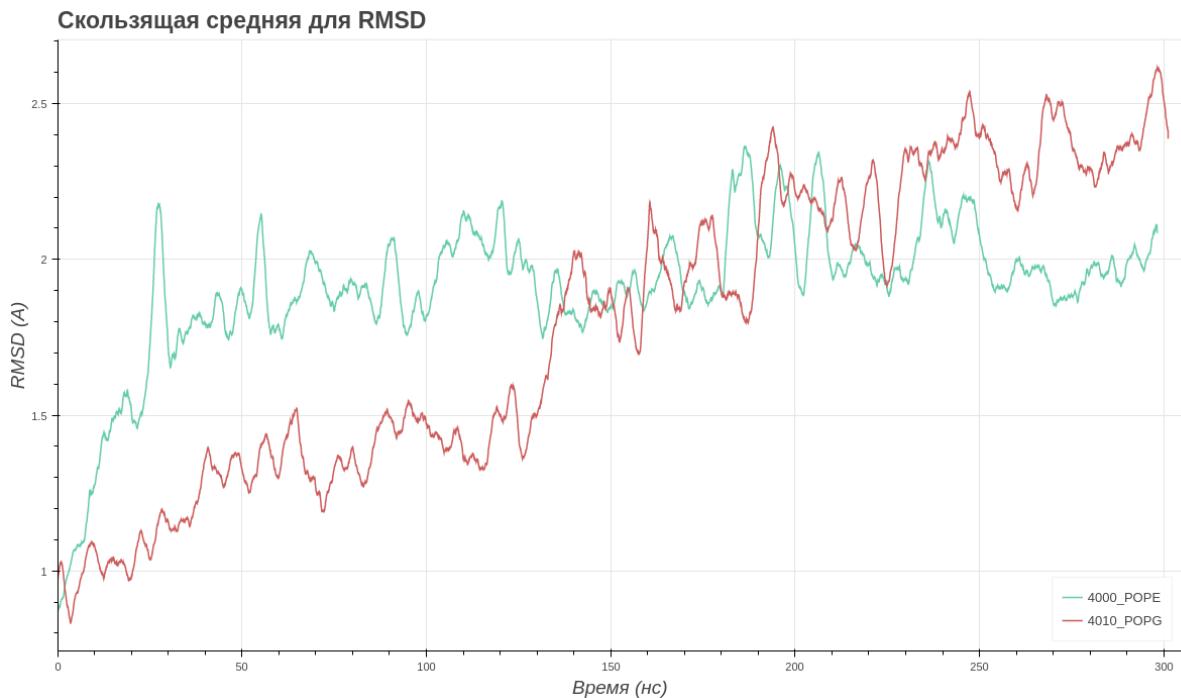


Рис. 17: RMSD

- [7] Albers S.-V., Meyer B. H. The archaeal cell envelope // Nat. Rev. Microbiol. — 2011. — June. — Vol. 9. — P. 414–426. 6, 7
- [8] Monoolein: a magic lipid? / C. V. Kulkarni, W. Wachter, G. Iglesias-Salto et al. // Phys. Chem. Chem. Phys. — 2011. — Vol. 13. — P. 3004–3021. 8
- [9] Room to move: crystallizing membrane proteins in swollen lipidic mesophases / V. Cherezov, J. Clogston, M. Z. Papiz, M. Caffrey // J. Mol. Biol. — 2006. — Vol. 357. — P. 1605–1618. 9
- [10] Tightly bound cardiolipin in cytochrome oxidase / Y. C. Awasthi, T. F. Chuang, T. W. Keenan, F. L. Crane // Biochim. Biophys. Acta. — 1971. — Vol. 26. — P. 42–52. 11
- [11] Biochemistry / M. K. Joshi, S. Dracheva, A. K. Mukhopadhyay, S. Bose // Importance of specificnative lipids in controlling the photocycle ofbacteriorhodopsin. — 1998. — Vol. 37. — P. 14463–14470. 11
- [12] Marsh D. Electron spin resonance in membrane research: protein–lipid interactions. // Methods. — 2008. — Vol. 46. — P. 83–96. 11

- [13] I. Valiyaveetil F., Y. Zhou, R. MacKinnon. Lipids in the structure, folding and function of the KcsA K⁺ channel // Biochemistry. — 2002. — Vol. 94. — P. 10771–10777. 11
- [14] The role of lipids in mechanosensation / Pliotas C., Dahl A. C., Rasmussen T., Mahendran K. R. // Nat. Struct. Mol. Biol. — 2015. — Vol. 22, no. 12. — P. 991–998. 12
- [15] Molecular driving forces defining lipid positions around aquaporin-0 / C. Aponte-Santamaría, R. Brionesa, A. D. Schenk, T. Walz // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2011. — Vol. 109, no. 25. — P. 9887–9892. 13
- [16] Stansfeld P. J., Sansom E. E. Jefferysand M. S. P. Multiscale Simulations Reveal Conserved Patterns of Lipid Interactions with Aquaporins // Structure. — 2013. — Vol. 21. — P. 810–819. 13
- [17] mutual adaptation of a membrane protein and its lipid bilayer during conformational changes / Y. Sonntag, M. Musgaard, C. Olesen et al. // Nat. Commun. — 2011. — Vol. 2, no. 304. 13, 14, 15
- [18] Oesterhelt D., Stoeckenius W. Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium halobium // Nat. new Biol. — 1971. — Vol. 233. — P. 149–152. 16
- [19] High-Resolution Structure of a Membrane Protein Transferred from Amphipol to a Lipidic Mesophase / V. Polovinkin, I. Gushchin, M. Sintsov, E. Round // J. Membrane Biol. — 2014. — Vol. 247, no. 9. — P. 997–1004. 17
- [20] Integral Membrane Proteins Can Be Crystallized Directly from Nanodiscs / M. Nikolaev, E. Round, I. Gushchin, V. Polovinkin // Cryst. Growth Des. — 2017. — Vol. 17, no. 3. — P. 945–948. 17
- [21] Butt H.-J., Wolff E. K., Gould S. A. C. Imaging cells with the atomic force microscope // J. Struct. Biol. — 1990. — Vol. 105, no. 1-3. — P. 54–61. 17
- [22] High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin / M. Shibata, H. Yamashita, Uchihashi, H. T., Kandori // Nat. Nanotechnol. — 2010. — Vol. 5. — P. 208–212. 17, 18

- [23] Wickstranda C., Dods R., A.Royant. Bacteriorhodopsin: Would the real structural intermediates please stand up? // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2015. — Vol. 1850, no. 3. — P. 536–553. 17
- [24] Grudinin S., Büldt G., Gordeliy V. Water Molecules and Hydrogen-Bonded Networks in Bacteriorhodopsin—Molecular Dynamics Simulations of the Ground State and the M-Intermediate // *Biophys. J.* — 2005. — Vol. 88, no. 5. — P. 3252–3261. 18
- [25] Wang T., Sessions A. O., Lunde C. S. Deprotonation of D96 in Bacteriorhodopsin Opens the Proton Uptake Pathway // *Cell.* — 2014. — Vol. 68. — P. 1423–1429. 18
- [26] An Approach to Heterologous Expression of Membrane Proteins. The Case of Bacteriorhodopsin / D. Bratanov, T. Balandin, E. Round et al. // *PloS ONE.* — 2015. — Vol. 10, no. 6. 18
- [27] Leach A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications.* — Pearson Education, 2001. 19
- [28] MAcKerell A. D., Dashfrd D., Bellbolt M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins // *J. Phys. Chem. B.* — 1998. — Vol. 102, no. 18. — P. 3386–3616. 19
- [29] The Amber biomolecular simulation programs / D. A. Case, T. E. Cheatham, T. Garden, H. Gohlke // *J. Comput. Chem.* — 2005. — Vol. 26, no. 16. — P. 1668–1688. 19
- [30] The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package / W. R. P. Scott, P. H. Hünenberger, I. G. Tironi, A. E. Mark // *J. Phys. Chem. A.* — 1999. — Vol. 103, no. 19. — P. 3396–3607. 19
- [31] GROMACS: Fast, flexible, and free / D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof // *J. Comput. Chem.* — 2005. — Vol. 26, no. 16. — P. 1701–1718. 20, 24
- [32] GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers / M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schultz, S. Pall // *SoftwareX.* — 2015. — Vol. 1-2. — P. 19–25. 20

- [33] Zhu S., Brown M. F., Feller S. E. Retinal Conformation Governs pK_a of Protonated Schiff Base in Rhodopsin Activation of Protonated Schiff Base in Rhodopsin Activation // J. Am. Chem. Soc. — 2013. — Vol. 135, no. 25. — P. 9391–9398. 20, 26
- [34] Jo S., aand V.G. Iyer T. Kim, Im W. CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM. // J. Comput. Chem. — 2008. — Vol. 29. — P. 1859–1865. 21
- [35] CHARMM-GUI Membrane Builder Toward Realistic Biological Membrane Simulations. / E. L. Wu, X. Cheng, S. Jo et al. // J. Comput. Chem. — 2014. — Vol. 35. — P. 1997–2004. 21
- [36] OPM: Orientations of Proteins in Membranes database / M. A. Lomize, A. L. Lomize, I. D. Pogozheva, H. I. Mosberg // Bioinformatics. — 2006. — Vol. 22, no. 5. — P. 623–625. 22
- [37] Comparison of simple potential functions for simulating liquid water / W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey // J. Chem. Phys. — 1983. — Vol. 79, no. 2. — P. 926–935. 22
- [38] Molecular dynamics with coupling to an external bath / H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, A. DiNola, J.R. Haak // J. Chem. Phys. — 1984. — Vol. 81. — P. 3684–3690. 23
- [39] Nose S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. // Mol. Phys. — 1985. — Vol. 52. — P. 255–268. 23
- [40] Hoover W. G. Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. // Phys. Rev. A. — 1985. — Vol. 31. — P. 1695–1697. 23
- [41] Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics // J. Mol. Graph. — 1996. — Vol. 14, no. 1. — P. 33–38. 25
- [42] Delano W. L. — The PyMOL Molecular Graphics System. — Delano Scientific, 2002.