

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:

д.ф.-м.н. Гущин И.Ю.

Долгопрудный 2017

Содержание

1	Введение	3
2	Литературный обзор	4
2.1	Мембранные белки	4
2.2	Липиды	5
2.2.1	Архейные и бактериальные липиды	5
2.2.2	Моноолеин	7
2.3	Взаимодействие мембранных белков и липидов	9
2.4	Бактериородопсин	9
3	Материалы и методы	11
3.1	Молекулярная динамика	11
3.2	Начальные структуры	11
3.2.1	Белок	11
3.2.2	Мембранные системы	11
3.3	Параметры моделирования	11
3.4	Анализ	11
4	Результаты и обсуждение	12

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 конфигурацию и свойства липидов.

Бактериородопсин - интегральный мембранный белок, осуществляющий перенос протона через бислой [1]. Впервые бактериородопсин был открыт у архей, мембраны которых имеют некоторую специфичность: вместо обычных жирных кислот гидрофобные части их липидов состоят из изопреновых групп и являются разветвленными. Благодаря таким метильным «ответвлениям» мембраны 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 монотопические), пронизывать мембрану насквозь (интегральные политопические, или трансмембранные) или быть связаны с бислоем, не встраиваясь в него (периферические), см. Рис. 1.

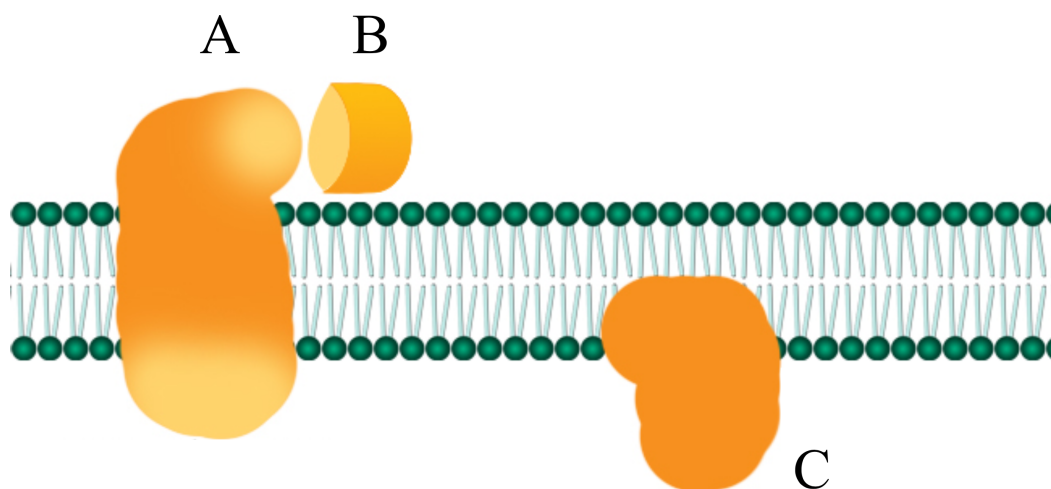


Рис. 1: Типы мембранных белков: А) трансмембранный; В) периферийный; с) интегральный монотопический.

Далее рассмотрим подробнее 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, межклеточ-

ном 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 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 мембранной 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 число уникальных структур должно достигнуть $\sim 2,800$ единиц.

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 живых организмов, и имеют большое число отличий. Одно

из них – строение клеточной мембраны.

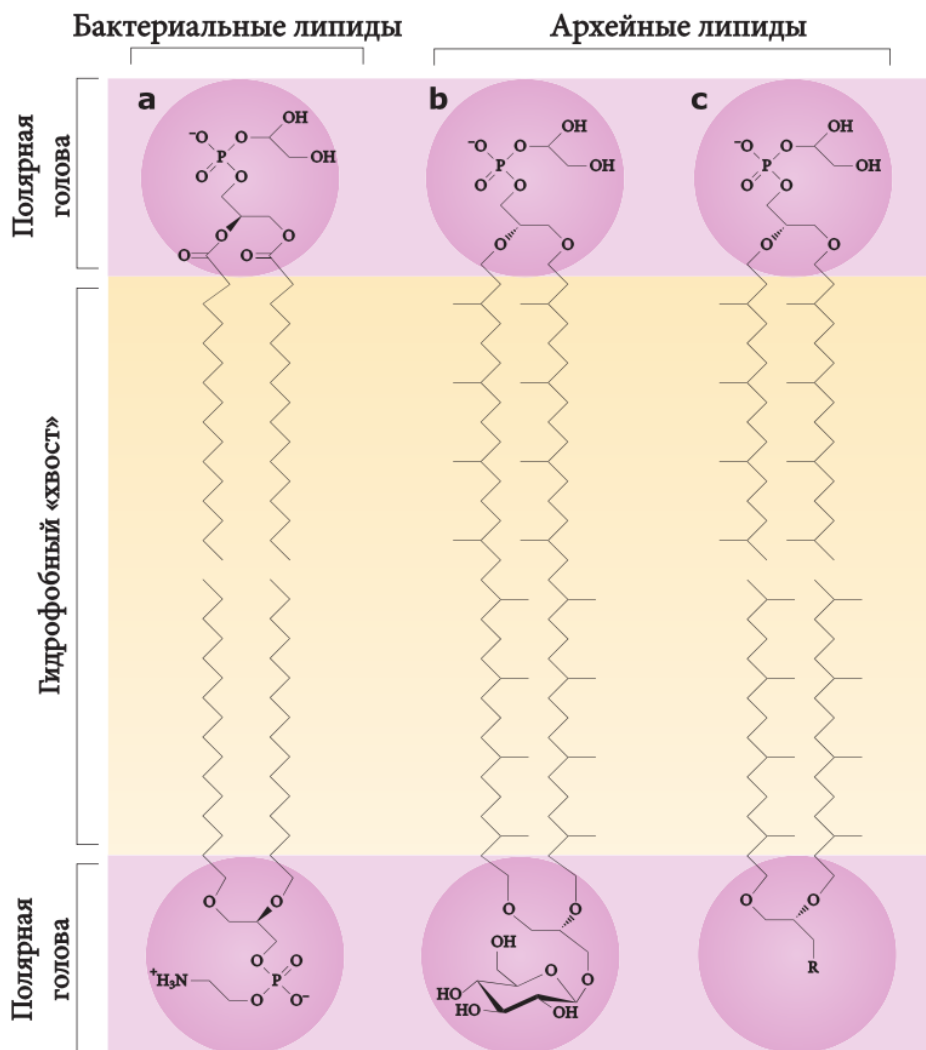


Рис. 2: Адаптировано из [5]. Строение бактериальных и архейных липидов: а) бактериальный липид; б) архейный биполярный липид; в) архейный монополярный липид.

Археи, большинство которых обитают в экстремальных условиях, губительных для других организмов – например, большие температуры, низкий или высокий pH, высокие концентрации ионов – имеют мембраны, липиды в которых обладают следующими характерными свойствами [5, 6]:

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 бислои, так и биполярными (две полярные головы, фактически два соединившихся «хвостами» монополярных липида), формирующими монослои.

Сравнение строения бактериальных и архейных липидов представлено на Рис. 2

2.2.2 Моноолеин

Моноолеин (МО) – 1-моно [цис-9-октадеценоил]-рац-глицерол – представляет собой углеводородный остаток C_{18} с двойной связью между C_9 и C_{10} , присоединенный к глицерину сложноэфирной связью (Рис. 3). Две оставшиеся гидроксильные группы глицерина составляют полярную часть и могут участвовать в формировании водородных связей. Таким образом, моноолеин – амфифильная молекула с гидрофильно-липофильным балансом (HLB) 3.8.

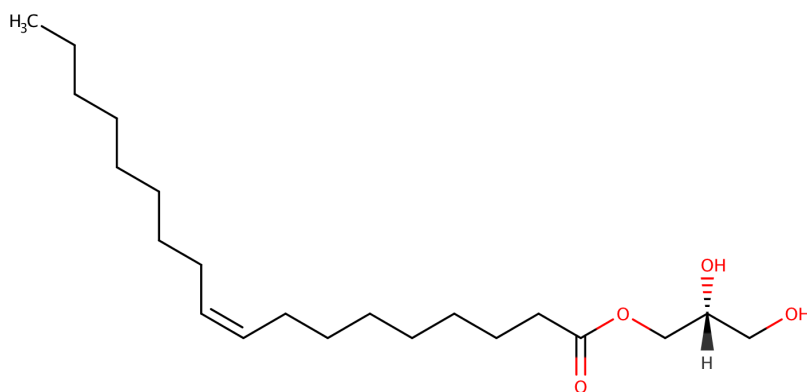


Рис. 3: Строение молекулы моноолеина

Развернутый обзор свойств и применения МО можно найти в [7].

Интерес к моноолеину 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 присутствии дополнительных компонентов и большей энергии (Рис. 4)

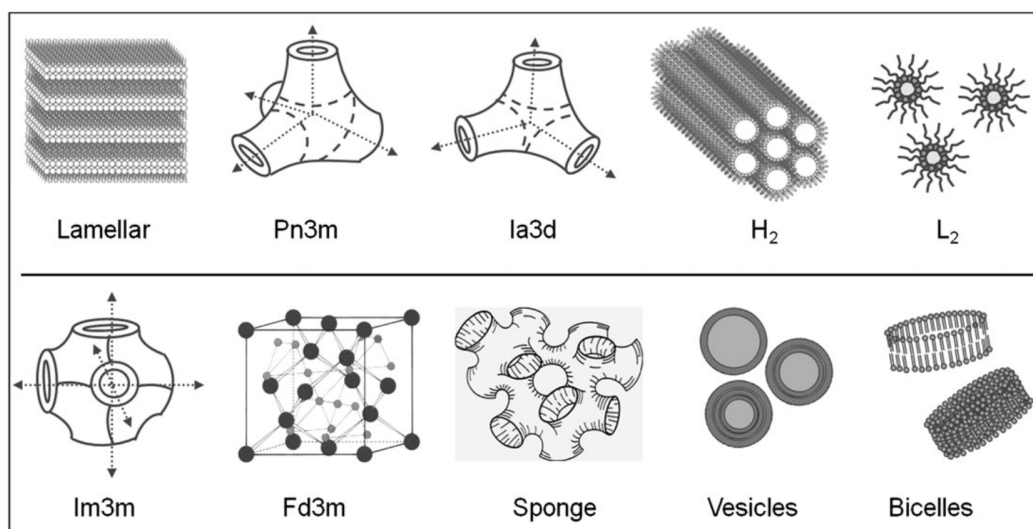


Рис. 4: Фазы, формируемые МО. В присутствии воды (верхний ряд): ламеллярная, биконтинуальные кубические фазы Pn3m и Ia3d, гексагональная H₂, жидкая изотропная (инверсная мицеллярная) L₂; дополнительные фазы, в присутствии воды и других компонентов, например, (глико)липидов, детергентов, солей (нижний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

С учетом многообразия лиотропных фаз МО, крайне важно уметь заранее предсказывать, 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 лиотропов с точки зрения фазового поведения, как теоретически, так и экспериментально. Одна из последних

фазовых диаграмм МО представлена на (Рис. 5, [8])

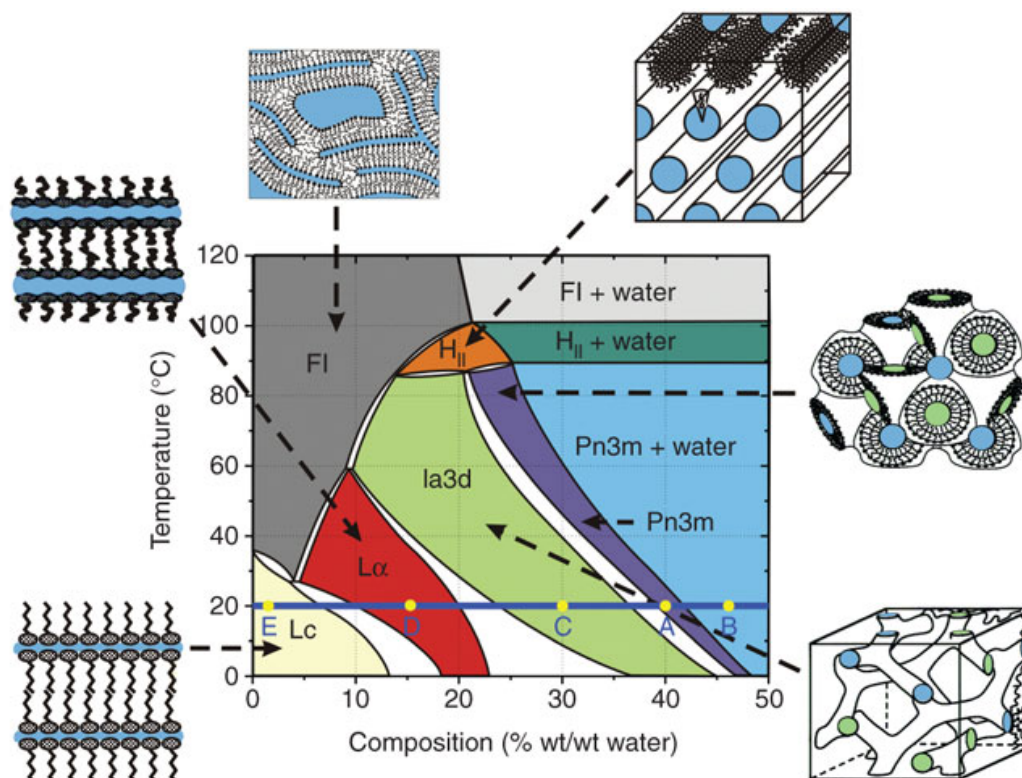


Рис. 5: Температурно-композиционная фазовая диаграмма МО. Цветные участки в графическом представлении фаз отвечают воде.

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

2.3 Взаимодействие мембранных белков и липидов

2.4 Бактериородопсин

Бактериородопсин (БР) – активируемый светом протонный насос – был впервые открыт как основной компонент так называемой пурпурной мембраны [9].

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 \AA , в дальнейшем улучшенное до немногим более атомарного.

Несмотря на то что БР не стал первым мембранным белком, кристаллографическая 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.

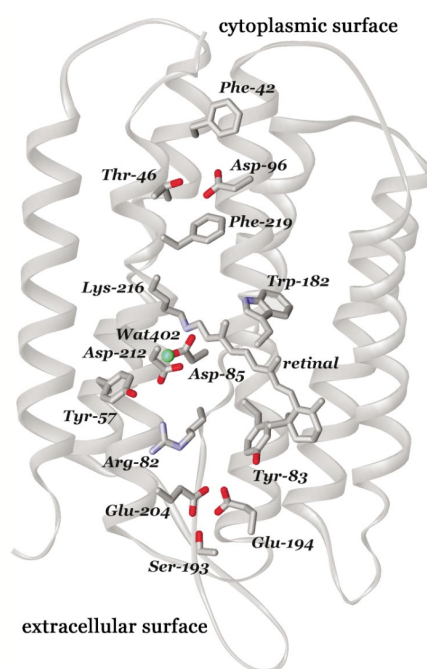


Рис. 6: Структура бактериоропсина, код PDB - 1C3W, [1].

Таблица 1: Среднее число пар, рождённых одиночным (слева) и двумя сталкивающимися (справа) циркулярно-поляризованными импульсами e -типа из вакуума, $\Delta = 0.1$

$I \cdot 10^{-28},$ Вт/см ²	E_0/E_S	N	$I \cdot 10^{-26},$ Вт/см ²	E_0/E_S	N
0.6	0.203	1.94(-5)	1.0	0.0262	2.36(-8)
0.8	0.234	5.57(-2)	1.5	0.0321	3.12(-3)
1.0	0.262	13.4	2.0	0.0371	3.85
1.5	0.321	7.57(4)	2.5	0.0414	5.20(2)
2.0	0.371	1.42(7)	3.0	0.0454	2.01(4)
2.5	0.414	5.29(8)	4.0	0.0524	3.59(6)
3.0	0.454	7.89(9)	5.0	0.0586	1.33(8)
4.0	0.524	3.70(11)	6.0	0.0642	1.95(9)
5.0	0.586	5.35(12)	7.0	0.0693	1.61(10)
6.0	0.642	4.05(13)	8.0	0.0741	8.94(10)
8.0	0.741	7.17(14)	9.0	0.0786	3.75(11)
10.0	0.829	5.33(15)	10.0	0.0829	1.28(12)

3 Материалы и методы

3.1 Молекулярная динамика

3.2 Начальные структуры

3.2.1 Белок

3.2.2 Мембранные системы

3.3 Параметры моделирования

3.4 Анализ

4 Результаты и обсуждение

Список литературы

- [1] Lanyi J. K. Bacteriorhodopsin // Annual Review of Physiology. — 2004. — Vol. 66. — P. 665–668. 3, 10
- [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. 5
- [5] Albers S.-V., Meyer B. H. The archaeal cell envelope // Nat. Rev. Microbiol. — 2011. — June. — Vol. 9. — P. 414–426. 6
- [6] Patel G. B., Sprott. Archaeal Membrane Lipids // eLS. — 2006. 6
- [7] Monoolein: a magic lipid? / C. V. Kulkarni, W. Wachter, G. Iglesias-Salto et al. // Phys. Chem. Chem. Phys. — 2011. — Vol. 13. — P. 3004–3021. 7
- [8] 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
- [9] Oesterhelt D., Stoerkenius W. Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium halobium // Nat. new Biol. — 1971. — Vol. 233. — P. 149–152. 9