

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

<b>1</b>	<b>Введение</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Литературный обзор</b>	<b>4</b>
2.1	Мембранные белки . . . . .	5
2.2	Липиды . . . . .	6
2.2.1	Архейные и бактериальные липиды . . . . .	6
2.2.2	Моноолеин . . . . .	8
2.3	Взаимодействие мембранных белков и липидов . . . . .	10
2.4	Бактериородопсин . . . . .	13
<b>3</b>	<b>Материалы и методы</b>	<b>16</b>
3.1	Молекулярная динамика . . . . .	16
3.2	Начальные структуры . . . . .	17
3.2.1	Белок . . . . .	17
3.2.2	Мембранные системы . . . . .	18
3.3	Параметры моделирования . . . . .	20
3.4	Анализ . . . . .	22
<b>4</b>	<b>Результаты и обсуждение</b>	<b>23</b>

# 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.

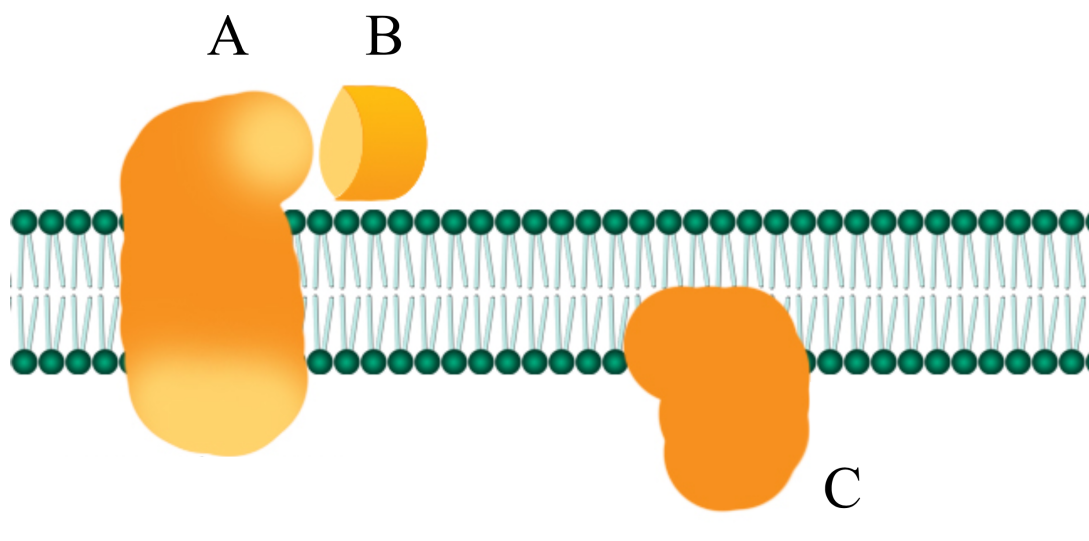


Рис. 1: Типы мембранных белков: А) трансмембранный; В) периферийный; с) интегральный монотопический.

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, 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 солюбилизованного 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.

Знание молекулярной структуры необходимо для понимания того, как белки функционируют, так как именно молекулярная структура определяет взаимодействие с другими молекулами. А зная структуру и используя компьютерные методы, можно подбирать молекулы, которые будут целенаправленно 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 мембраны, 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 бислои, так и биполярными (две полярные головы, фактически два соединившихся «хвоста» монополярных липида), формирующими монослой.

Сравнение строения бактериальных и архейных липидов представлено на Рис. 2

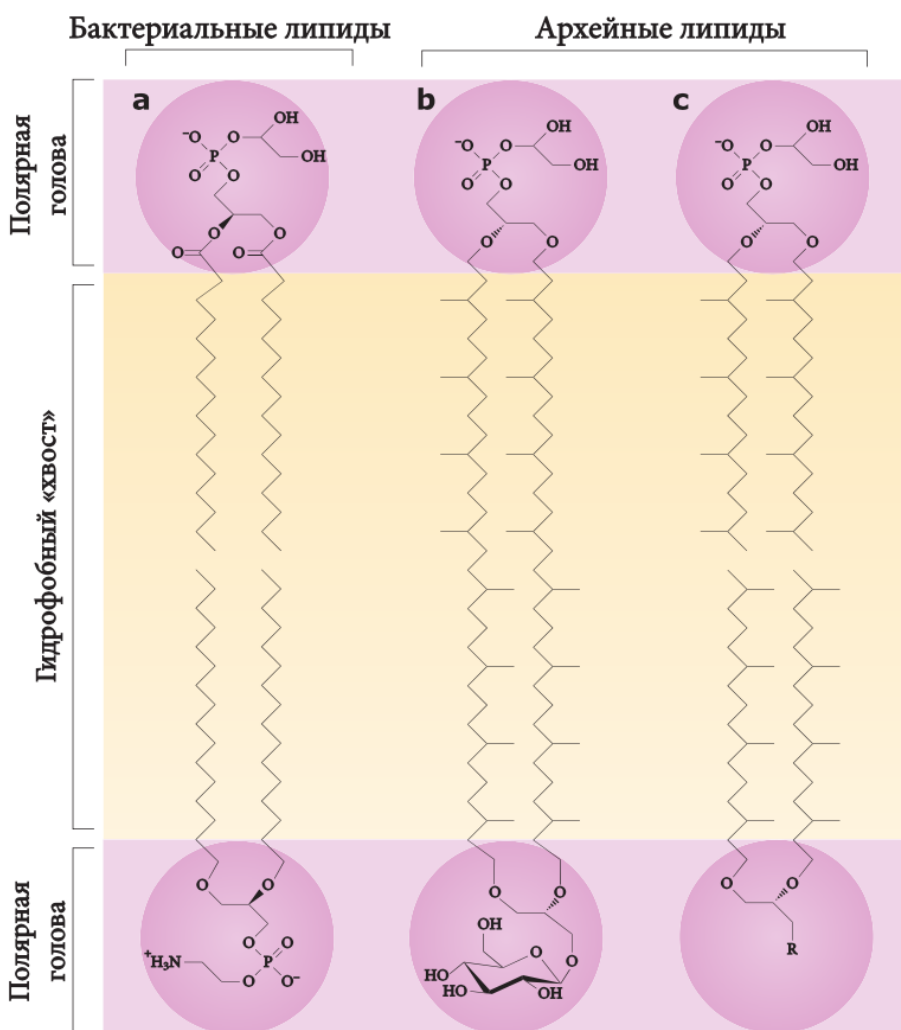


Рис. 2: Адаптировано из [7]. Строение бактериальных и архейных липидов: а) бактериальный липид; б) архейный биполярный липид; в) архейный монополярный липид.

### 2.2.2 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.

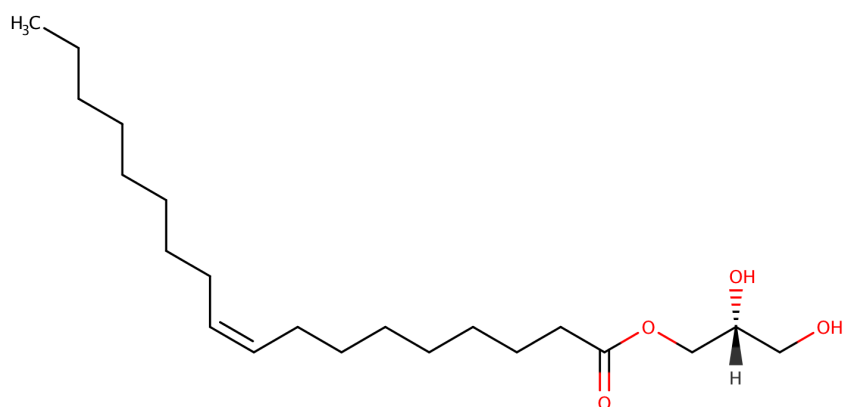


Рис. 3: Строение молекулы моноолеина

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

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 )

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



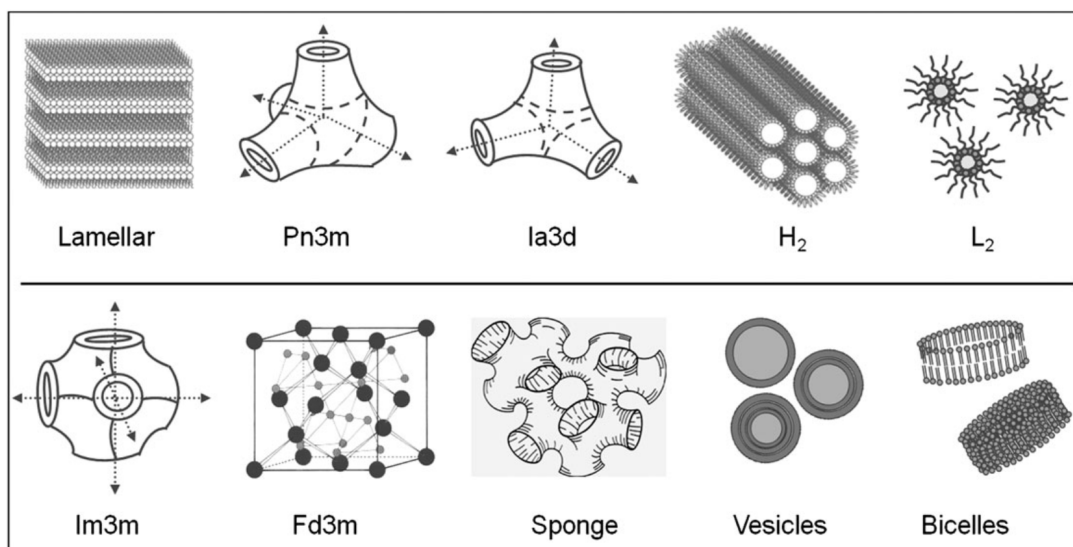


Рис. 4: Фазы, формируемые МО. В присутствии воды (верхний ряд): ламеллярная, биконтинуальные кубические фазы  $Pn3m$  и  $Ia3d$ , гексагональная  $H_2$ , жидкая изотропная (инверсная мицеллярная)  $L_2$ ; дополнительные фазы, в присутствии воды и других компонентов, например, (глико)липидов, детергентов, солей (нижний ряд): биконтинуальная кубическая фаза  $Im3m$ , мицеллярная кубическая  $Fd3m$ , губчатая, везикулы, бицеллы.

сказывать, какая фаза будет сформирована при определенных условиях. Теоретически это возможно, так как система находится в той или иной фазе, исходя из принципов 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 лиридов 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

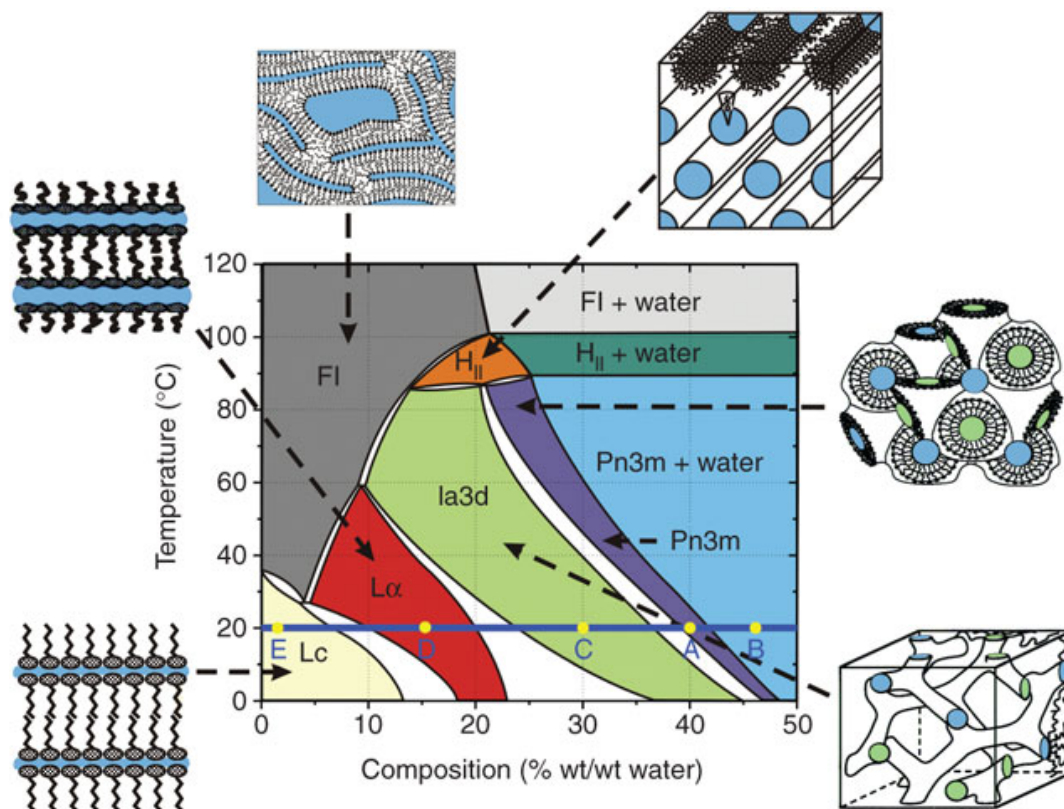


Рис. 5: Температурно-композиционная фазовая диаграмма МО. Цветные участки в графическом представлении фаз отвечают воде.

поведения и химических свойств, а также биосовместимость. Главным образом, МО используется в виде 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

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 изменениях в мембранных белках.

Примером влияния липидов на функциональность белков является решенная в структуре цитохром с-оксидазы молекула 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 слоев аннулярных 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 подвижности, непосредственно взаимодействующих с белком, и остальные молекулы, по подвижности 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  $1-2 \times 10^7 \text{ с}^{-1}$  при 37 °C [12]. Такая подвижность свидетельствует о том, что положения вблизи белка не дают какого-то значительного выигрыша в энергии, и подвижность липидов ограничивается 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 исследование механочувствительных каналов MscS

в *E. coli* [14]. Данных 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 мембране 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 мембранного белка.

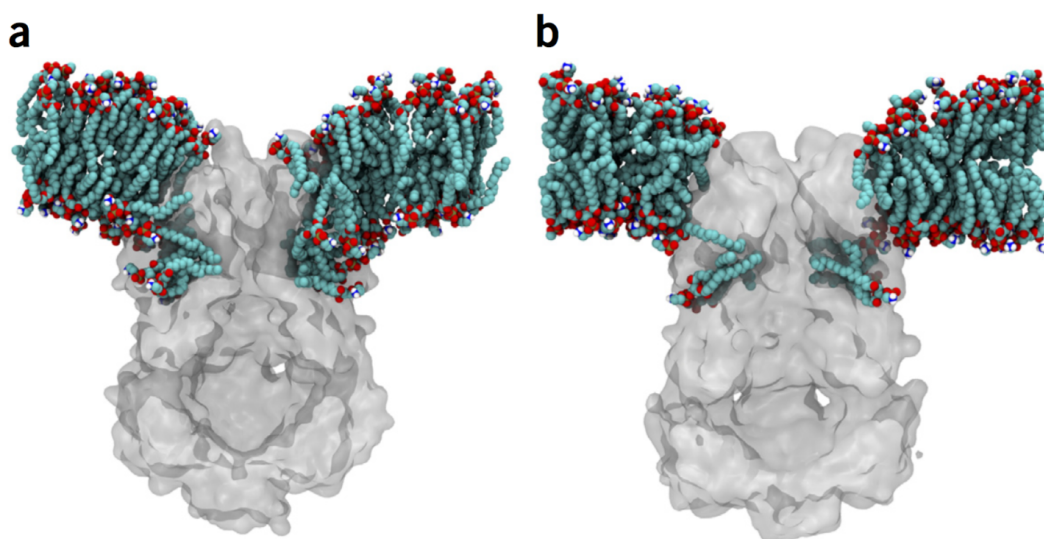


Рис. 6: [14] Срезы мембраны с механочувствительным каналом MscS. а) закрытая конформация; б) открытая конформация.

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

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 бислои даже самого простого живого организма – сложная гетерогенная система.

## 2.4 Бактериородопсин

Бактериородопсин (БР) – активируемый светом протонный насос – был впервые открыт как основной компонент так называемой пурпурной мембраны [15]. 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  $7 \text{ \AA}$ , 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. БР использовался для разработки методик кристаллизации в мезофазе из нанодисков и амфиполей [16, 17]. БР исследовался методом атомной силовой микроскопии, при этом простая АСМ подвернула упаковку БР в пурпурных мембранах [18], а высокоскоростная показала движение БР в мембране и его гексагональную упаковку тримерами [19]. Наконец, БР и пурпурные мембраны широко изучаются *in silico*.

Подробный обзор структурных и функциональных исследований БР можно найти в [1, 20]. Структура приведена на Рис. 7. Мономер БР состоит из 7  $\alpha$ -спиралей, соединенными короткими межспиральными участками и окружающими молекулу кофактора ретиналя, соединенного с остатком лизина (Lys216). Ретиналь принимает непосредственное участие в транспорте протона.

Механизм переноса протона состоит в следующем (Рис. 8). В основном состоянии протон локализован в соединяющем ретиналь с лизином шиффовом основании, к которому водородной связью присоединена молекула воды Wat402. Wat402 скоординирована также аминокислотными остатками Asp85 и Asp212. При этом объем, где находится Wat402 и еще две молекулы воды ограничен ретиналем 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

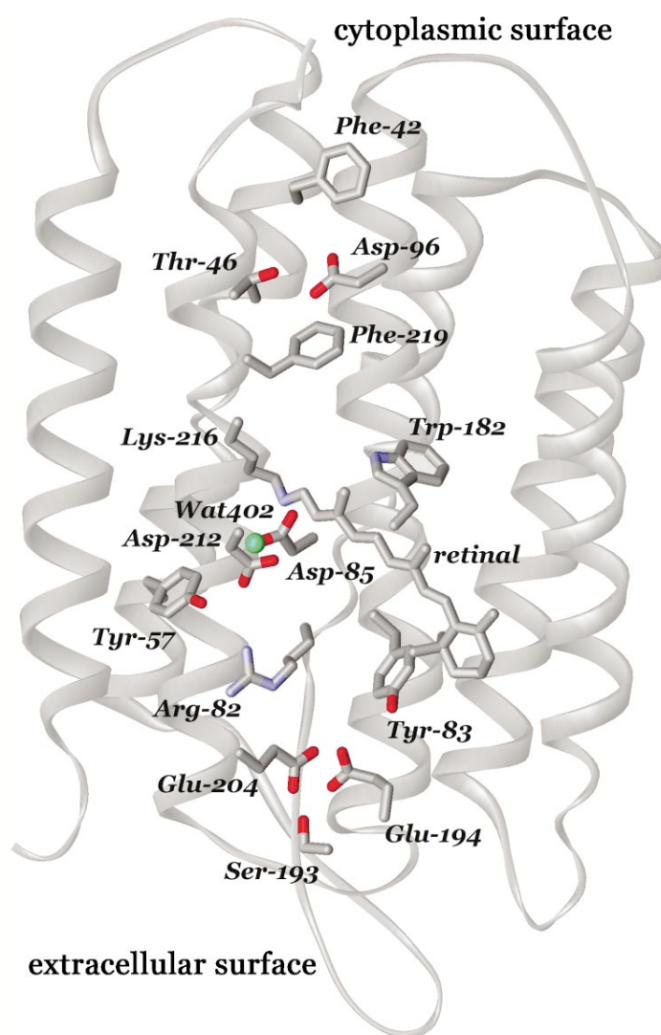


Рис. 7: Структура бактериоропсина, код PDB - 1C3W, [1]. Показана третичная структура, функциональные остатки, ретиналь и молекула воды *Wat402*.

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 М-состоянии этот остаток отворачивается от шиффового 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 [19, 21, 22])

Хотя общие принципы фотоцикла БР давно понятны, но детали механизмов пере-

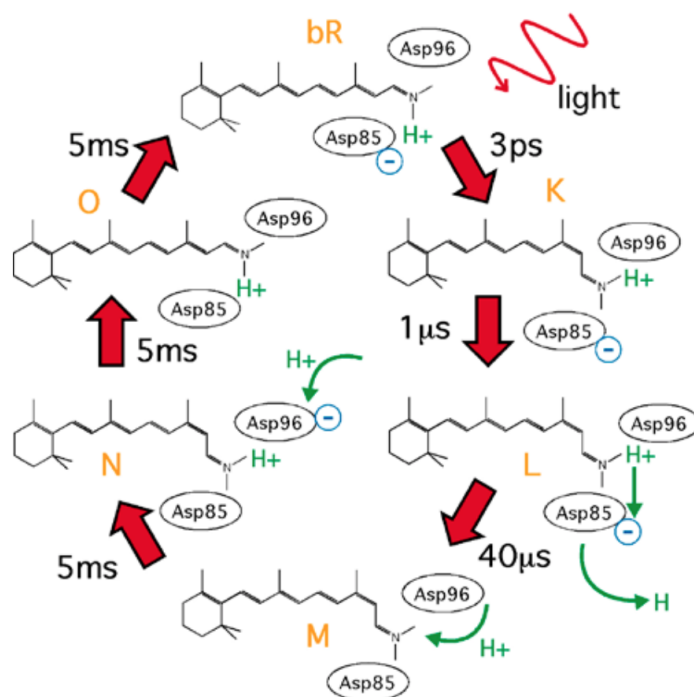


Рис. 8: Фотоцикл бактериоропсина.

носа, 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* [23], 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 подобранной 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 [24].

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  $\theta$  и двугранных углов  $\phi$  и  $\psi$ .  $k_b$ ,  $k_\theta$ ,  $k_\phi$ ,  $k_\psi$  – параметры, описывающие поведение ковалентносвязанных атомов,  $b_0$ ,  $\theta_0$ ,  $\phi_0$ ,  $\psi_0$  – равновесные значения длины ковалентной связи  $b$ , плоских углов  $\theta$ , двугранных углов  $\phi$  и  $\psi$ ,  $n$  – кратность. Последние два члена суммы отвечают за потенциал Леннарда-Джонса и кулоновское взаимодействие, где  $\epsilon_{ij}$  – глубина потенциальной ямы,  $\sigma_{ij}$  – эффективный диаметр частицы,  $q_i$  и  $q_j$  – заряды на атомах и  $\epsilon_d$  – константа кулоновского потенциала. Выбор параметров основан на экспериментальных данных и квантовомеханических вычислениях.

В данный момент существует довольно большое многообразие силовых полей: CHARMM [25], AMBER [26], GROMOS [27] 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 молекулярной динамики критична длина траектории. В настоящий момент для моделирования мембранных систем доступны времена порядка  $\sim 1$  мкс.

Для расчета траекторий методом молекулярной динамики использовался программный пакет GROMACS [28,29]. 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 стартовые структуры: 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 1QNJ. При этом к остатку Lys216 был ковалентно присоединен ретиналь, новый остаток был переименован в Lyr216. 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. 9). Поэтому параметры были взяты и адаптированы для CHARMM36 из приложения к S. Zhu et al., 2013 [30].

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

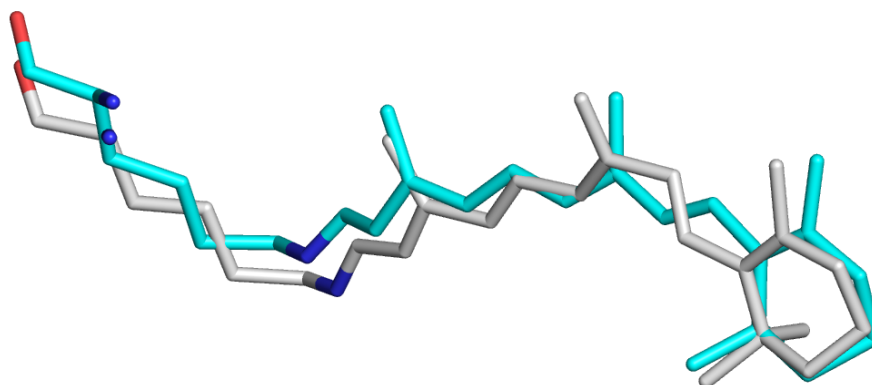


Рис. 9: Сравнение остатков LYR. Серым показан LYR из кадра траектории, для получения которой использовались параметры топологии ретиналя из CHARMM36, голубым – измененная параметры топологии.

### 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. 10), 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолил (DPhPC) (Рис. 10) и моноолеин (Рис. 3). POPC выступает в качестве модельного бактериального липида, DPhPC – архейного, а моноолеин – как один из самых распространенных детергентов. Для каждого из перечисленных липидов была построена отдельная мембранная система.

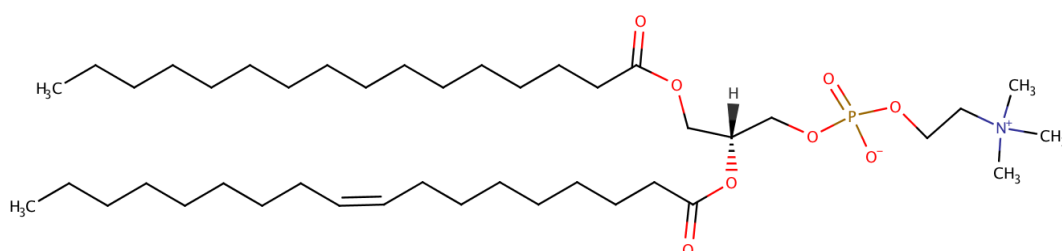


Рис. 10: Строение молекулы POPC.

Для вставки бактериородопсина в мембрану использовался сервер CHARMM-

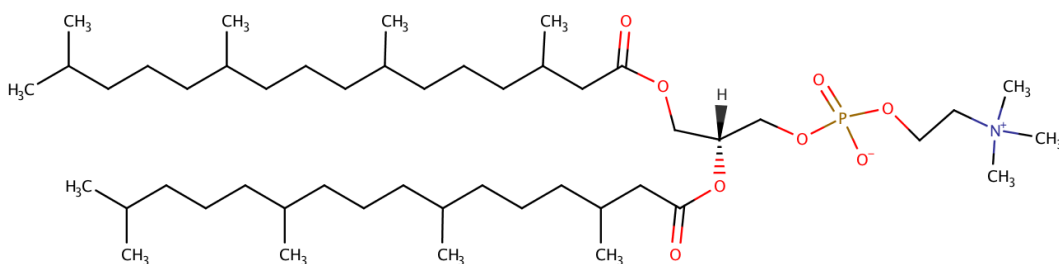


Рис. 11: Строение молекулы DPhPC.

GUI [31, 32]. Ориентация белка в мембране была выбрана в соответствии с базой данных OPM [33]. CHARMM-GUI позволяет выбрать липиды для бислоя из его базы, при этом POPC и DPhPC (под названием PNPС) в ней присутствует, а моноолеин нет. Поэтому для системы с бислоем из моноолеина белок был первоначально вставлен в 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолил (DOPC) (Рис. 12). 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. Граничные атомы (Р и О) были заменены на водороды, связи с ними уравнивались на этапе минимизации энергии.

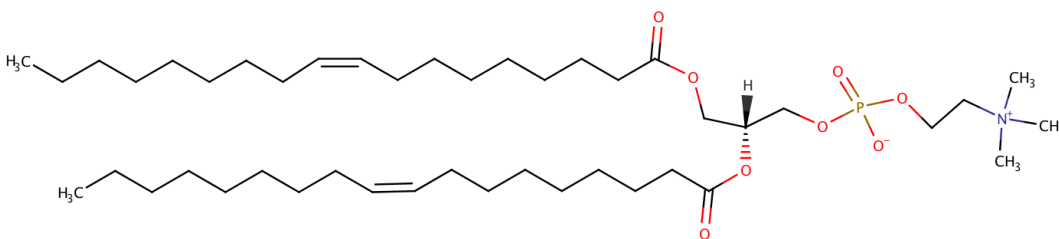


Рис. 12: Строение молекулы DOPC.

Каждая из систем содержит 256 молекул липидов, по 128 в каждом монослое. Количество молекул воды определялось исходя из гидратационного числа для липидов: в случае POPC и PNPС оно равно 40, в случае моноолеина – 30, ввиду меньшего размера молекулы. Следовательно, в системах с POPC и PNPС по 12800 молекул воды, в системе с моноолеином – 8960. Используемая модель воды – TIP3P [34]. Во всех системах была выбрана одинаковая суммарная концентрация ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , рассчитанная по количеству воды и равная 1 М. Сводная информация по составу

систем представлена в табл. 1.

Таблица 1: Состав мембранных систем.

Название системы	Липид	Кол-во молекул липида	Кол-во молекул воды	Количество катионов $\text{Na}^+$	Количество анионов $\text{Cl}^-$	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

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 периодические 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 [35] и Нозе-Гувера [36, 37]. 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  $\tau_T$ . 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 –  $4.5 \times 10^{-5}$  бар $^{-1}$ , константа связывания – 5.0 пс.

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

Остов белка закреплен, за исключением остатков с номерами 5-7, 32-37, 156-163, 230-232.

Интегрирование производилось с помощью стандартного интегратора leap-frog [28], с временным шагом интегрирования 2 фс. Список взаимодействующих неграничных 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 с частотой 12500 кадров или 25 фс.

### 3.4 Анализ

Для анализа полученных траекторий использовался ряд программ из пакета GROMACS:

- `gmx_make_nd` позволяет создавать и изменять index-файлы, т.е. группы атомов, которые должны быть избранно использованны другими программами;
- `gmx_pdb2gmx` добавляет отсутствующие атомы водорода;
- `gmx_trjconv` конвертируют 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;

Основными средствами визуализации были программы VMD [38] и PyMOL.

## 4 Результаты и обсуждение

## Список литературы

- [1] Lanyi J. K. Bacteriorhodopsin // Annual Review of Physiology. — 2004. — Vol. 66. — P. 665–668. 3, 13, 14
- [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
- [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 specific native lipids in controlling the photocycle of bacteriorhodopsin. — 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<sup>+</sup> 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] Oesterhelt D., Stoeckenius W. Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of *Halobacterium halobium* // *Nat. new Biol.* — 1971. — Vol. 233. — P. 149–152. 13
- [16] 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. 13
- [17] 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. 13
- [18] 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. 13
- [19] 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. 13, 14
- [20] Wickstranda C., Dodsa R., A.Royant. Bacteriorhodopsin: Would the real structural intermediates please stand up? // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2015. — Vol. 1850, no. 3. — P. 536–553. 13
- [21] 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. 14

- [22] 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. 14
- [23] 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. 15
- [24] Leach A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. — Pearson Education, 2001. 16
- [25] 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. 16
- [26] 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. 16
- [27] 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. 16
- [28] 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. 17, 21
- [29] 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. 17
- [30] 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. 17
- [31] 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. 19

- [32] 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. 19
- [33] 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. 19
- [34] 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. 19
- [35] 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. 20
- [36] Nose S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. // Mol. Phys. — 1985. — Vol. 52. — P. 255–268. 20
- [37] Hoover W. G. Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. // Phys. Rev. A. — 1985. — Vol. 31. — P. 1695–1697. 20
- [38] Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics // J. Mol. Graph. — 1996. — Vol. 14, no. 1. — P. 33–38. 22