

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. Ломоносова

---

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
КАФЕДРА БИОИНЖЕНЕРИИ

**Изучение молекулярных механизмов ионной проводимости  
бактериального калиевого канала KcsA  
методами молекулярного моделирования**

*Дипломная работа  
студентки 5 курса  
Касимовой М.А.*

*Научный руководитель  
к.ф.-м.н. Шайтан А.К.*

Москва, 2011

# Аннотация

Работа посвящена изучению процесса проведения ионов калия калиевым каналом с помощью методов молекулярного моделирования. Проводится обзор литературных данных по объекту изучения, бактериальному калиевому каналу KcsA. Описываются теоретические основы компьютерного молекулярного моделирования в рамках классических силовых полей, приведено описание метода оценки свободной энергии системы.

Практическая часть работы состоит в применении классического метода молекулярной динамики к изучению процесса проведения ионов через канал. Процесс проведения ионов был смоделирован при различных внешних условиях: различном значении напряженности электрического поля и различном значении концентрации калиевой соли в воде. На основе траекторий молекулярной динамики были построены вольтамперные характеристики KcsA. Были выявлены два механизма проведения ионов калия через ионный канал. С помощью метода Adaptive biasing force были рассчитаны профили свободной энергии для одного иона в канале и для триплета ионов, находящихся в селективном фильтре, при различных условиях напряженности внешнего поля.

# Оглавление

|   |               |
|---|---------------|
| <b>ВВЕДЕНИЕ</b>   | <b>- 6 -</b>  |
| <b>Постановка задачи</b>  | <b>- 6 -</b>  |
| <b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>  | <b>- 7 -</b>  |
| <b>1.1. ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ: БАКТЕРИАЛЬНЫЙ КАЛИЕВЫЙ КАНАЛ KcsA.</b>   | <b>- 7 -</b>  |
| 1.1.1. Четвертичная структура бактериального калиевого канала KcsA. Селективный фильтр, водная полость, главные ворота, терминальные домены.                        | - 7 -         |
| 1.1.2. Закрытая и открытая структуры KcsA. Теоретические методы построения открытой структуры. Экспериментальное получение открытой структуры.                      | - 10 -        |
| 1.1.3. Условия открытия KcsA. Ключевые аминокислотные остатки, ответственные за открытие калиевого канала при снижении pH среды.                                    | - 13 -        |
| 1.1.4. Вторые ворота калиевого канала, расположенные на уровне СФ. Типы инактивации KcsA. Схема работы калиевого канала по Chakrapani S. et al.                     | - 15 -        |
| 1.1.5. Карбоксилат-карбоксилатный мостик между остатками E71 и D80, расположенными на уровне СФ. Зависимость проводимости KcsA от состава липидной мембраны.        | - 18 -        |
| 1.1.6. Механическая связь между главными воротами и СФ канала. Схема работы KcsA по Cuello L. et al.  | - 21 -        |
| 1.1.7. Изучение проводимости калиевых каналов теоретическими методами: броуновская и молекулярная динамика. Общие принципы проведения ионов через KcsA.             | - 23 -        |
| <b>1.2. МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА.</b>  | <b>- 25 -</b> |
| 1.2.1. Метод классической молекулярной динамики. Представление системы в виде совокупности материальных точек. Вклады в потенциальную энергию. Силовые поля.        | - 25 -        |
| 1.2.2. Понятие свободной энергии как потенциала средней силы. Метод Adaptive Biasing Force.   | - 27 -        |
| 1.2.3. Основные принципы моделирования калиевого канала KcsA. Моделирование напряжения на мембране.   | - 28 -        |
| <b>ГЛАВА 2. СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ СИСТЕМЫ: КАЛИЕВЫЙ КАНАЛ KcsA В МЕМБРАНЕ</b>   | <b>- 30 -</b> |
| 2.1.1. Структуры KcsA, представленные в белковой базе данных. Программа HOLE. Подготовка структуры калиевого канала к молекулярной динамике.                        | - 30 -        |
| 2.1.2. Построение системы KcsA в фосфолипидной мембране. Модель мембраны ДПФХ. Программа G_MEMBED. Результаты молекулярной динамики системы.                        | - 34 -        |
| <b>ГЛАВА 3. МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПРОВЕДЕНИЯ ИОНОВ ЧЕРЕЗ KcsA</b>  | <b>- 39 -</b> |
| 3.1.1. Карта электростатического потенциала в системе в условиях разности зарядов по обе стороны фосфолипидной мембраны.  | - 39 -        |
| 3.1.2. Моделирование процесса проведения ионов калия через KcsA. Вольтамперная характеристика калиевого канала. Два механизма проводимости. Изменение структуры СФ. | - 40 -        |
| 3.1.3. Построение профилей свободной энергии по методу ABF для одного иона калия в канале и для триплета ионов в СФ.  | - 43 -        |

**ВЫВОДЫ** **- 47 -**

---

**ПРИЛОЖЕНИЕ** **- 48 -**

---

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ** **- 50 -**

---

## **Список сокращений:**

|             |  |
|-------------|--|
| <b>ДПФХ</b> | дипальмитоилфосфатидилхолин                              |
| <b>ПОФХ</b> | пальмитоилолеилфосфатидилхолин                           |
| <b>ПСС</b>  | профиль средней силы                                     |
| <b>СКО</b>  | среднеквадратичное отклонение                            |
| <b>СФ</b>   | селективный фильтр                                       |
| <b>ТМ</b>   | трансмембранный  |
| <b>ЭПР</b>  | электронный парамагнитный резонанс                       |
| <b>ЯМР</b>  | ядерный магнитный резонанс                               |
| <b>ABF</b>  | Adaptive Biasing Force (Метод Адаптивной Смещающей Силы) |

# Введение

Ионные каналы — порообразующие белки, поддерживающие разность потенциалов, которая существует между внешней и внутренней сторонами клеточной мембраны всех живых клеток. Трансмембранный транспорт ионов через каналы лежит в основе генерации электрической активности в нервных и мышечных клетках, контроля возбудимости сердечной мышцы, внутриклеточной передачи сигнала, секреции многих гормонов, клеточной пролиферации и регуляции клеточного объема [1]. Дисфункция каналов приводит к ряду патологий, начиная с нарушения координации движений и сердечной недостаточности и заканчивая сахарным диабетом. Актуальность изучения их структуры и функционирования обусловлена необходимостью понимания причин возникновения данных патологий и дальнейшей разработки нового типа лекарств, нацеленных на канал, как на мишень. Изучению работы ионных каналов уделяется большое внимание в современной молекулярной биофизике [2]. Среди всего арсенала методов особое место занимает молекулярное моделирование. В отличие от молекулярно-биологических и электрофизиологических методов молекулярное моделирование позволяет получить данные о динамике процессов атомистического уровня.

## Постановка задачи.

В качестве объекта изучения был выбран бактериальный калиевый канал KcsA, который является упрощенной моделью потенциал-зависимых калиевых каналов возбудимых клеток эукариот. Целью настоящей работы является изучение механизмов проведения ионов калия через KcsA. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- 1) построить модель открытого калиевого канала KcsA в фосфолипидной мембране;
- 2) смоделировать процесс проведения ионов калия под действием внешнего электрического поля;
- 3) рассчитать профиль свободной энергии для одного иона калия в канале и для триплета ионов калия в селективном фильтре, оценить энергетический барьер, преодолеваемый ионами при прохождении через пору канала, проследить изменение величины энергетического барьера при изменении напряженности внешнего поля.

# Глава 1

## Обзор литературы

Раздел «Обзор литературы» состоит из двух отдельных частей. В первой части раздела приведено подробное описание структуры и функционирования объекта изучения, составленное на основе теоретических и экспериментальных данных, известных из литературы. Во второй части раздела кратко описаны методы молекулярного моделирования, использованные в данной работе.

### **1.1. Объект изучения: бактериальный калиевый канал KcsA.**

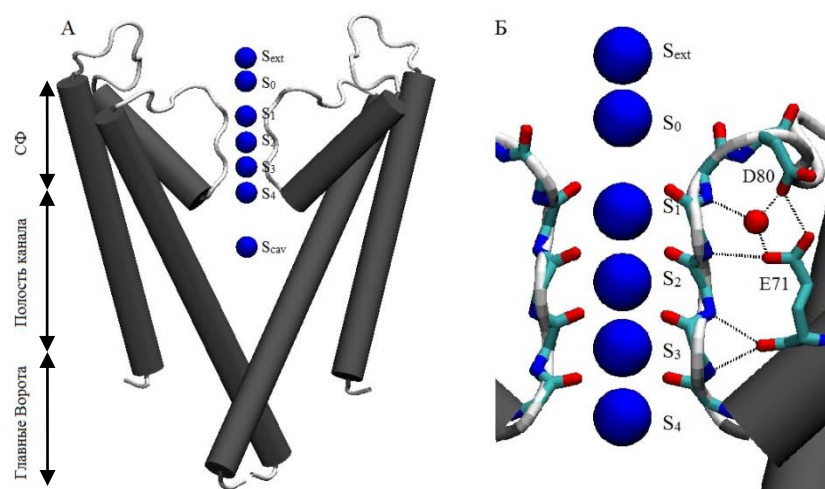
В данной части раздела «Обзор литературы» приведено описание строения бактериального калиевого канала KcsA, основные функции объекта изучения: переход между закрытым, открытым и инактивированным состояниями, ионная проводимость.

#### **1.1.1. Четвертичная структура бактериального калиевого канала KcsA. Селективный фильтр, водная полость, главные ворота, терминальные домены.**

Четвертичная структура KcsA была разрешена группой исследователей под руководством профессора MacKinnon в 1998 году [3]. KcsA состоит из четырех идентичных субъединиц, т.е. представляет собой гомотетрамер. Каждая субъединица состоит из двух ТМ спиралей (M1 и M2), нисходящей поровой спирали (Р-спираль) и восходящей петли (F-участок), соответствующей селективному фильтру канала (Рисунок 1А). Форма KcsA описывается как фигура вида «конус внутри конуса». Внешний конус образован M2 спиралями, внутренний – M1 спиралями. Структуру KcsA можно условно разделить на три участка – внешнее преддверие, водная полость канала, внутреннее преддверие. Диаметр поры варьирует в зависимости от координаты на оси канала: во внешнем преддверии – 1.4 Å, в водной полости – 5-6 Å, во внутреннем преддверии – 2 Å.

Внешнее преддверие соответствует области селективного фильтра канала. Селективный фильтр (далее СФ) построен 20 аминокислотными остатками, по 5 от каждой субъединицы, соответствующими характерной последовательности калиевых каналов – TVGYG (треонин, валин, глицин, тирозин, глицин), и представляет самую

узкую часть KcsA (радиус поры – 1.4 Å) длиной 12 Å [4]. Карбонильные атомы кислорода аминокислотных остатков, а также гидроксильные атомы кислорода треонина обращены в пору калиевого канала и образуют структуру типа кубической антипризмы [5]. Возможность развернуть все карбонильные кислороды в сторону поры обусловлена наличием малых аминокислотных остатков – глицинов, не обладающих боковой группой [3]. Структура СФ поддерживается сетью водородных связей между аминокислотными остатками, прилегающими к нему и водой. При высокой концентрации ионов калия в среде водородные связи между остатками E71 и D80, G79 и водой (молекула воды внутри белка), расположенными сразу за СФ, удерживают его в нужной конформации (Рисунок 1Б). Присутствие молекулы воды рядом с СФ канала важно для поддержания стабильности его структуры: с помощью методов молекулярного моделирования было показано, что если молекулу воды убрать, то пептидная связь на уровне S1 сайта вывернется в сторону поры [6]. При низкой концентрации ионов калия карбонильный атом кислорода V76 отворачивается от оси канала. Он, а также кислород G77 соседней субъединицы образуют водородную связь с молекулой воды. Ca атом G77 поворачивается к оси канала, за счет этого происходит уменьшение радиуса поры на уровне СФ [5].



**Рисунок 1: Калиевый канал KcsA. Строение.**

А: Вид сбоку. В целях наглядности на рисунке изображены только две субъединицы из четырех. Серым цветом обозначены α-спирали, белым – петли. Синим цветом обозначены ионы калия. S<sub>ext</sub>, S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> – сайты связывания ионов калия. Б: СФ канала. Черными пунктирными линиями изображены водородные связи между остатками E71, D80, G79. Красной сферой изображена молекула воды. См. пояснения в тексте.

Молекулы воды гидратной оболочки иона калия находятся в вершинах кубической антипризмы. В канале структуру четырех последовательно расположенных кубических антипризм образуют атомы кислорода, обращенные в пору СФ. Входящий в СФ ион калия снимает гидратную шубу в связи с тем, что радиус поры на уровне СФ, 1.4 Å, соответствует радиусу иона, 1.33 Å. Чтобы компенсировать часть энергии, затраченной на



дегидратацию иона, канал образует сайт связывания иона калия в форме сольватной оболочки, в вершинах которой находятся атомы кислорода аминокислотных остатков. Таким образом, энергетические затраты на проведение иона через мембрану значительно снижаются. Для высокой концентрации ионов калия в среде на уровне СФ и в прилегающих областях было обнаружено семь сайтов связывания ионов калия. Четыре сайта связывания расположены в СФ –  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ ; два во внешней преддверии –  $S_0$ ,  $S_{ext}$  (ранее были предсказаны теоретически на основе рассчитанных профилей свободной энергии иона в канале); и один в полости канала –  $S_{cav}$  (Рисунок 1). На уровне СФ сольватную оболочку образуют атомы кислорода карбонильной и гидроксильной групп. В  $S_{ext}$  и  $S_{cav}$  сайтах в вершинах антипризмы находятся молекулы воды, в  $S_0$  сольватную оболочку образуют карбонильные кислороды и молекулы воды. Для низкой концентрации ионов калия в среде только два сайта заполнены ионами калия –  $S_4$  и  $S_1$ , в  $S_3$  сайте находится вода,  $S_2$  остается пустым. В  $S_{cav}$  сайте находится ион натрия, т.к. выделение кристаллов проводили в среде с высокой концентрацией соли натрия [5]. Образование сайта связывания в полости канала обусловлено определенным расположением поровых спиралей. Спирали находятся под углом к оси канала и направлены в точку расположения сайта связывания. Концы спиралей, обращенных к иону, являются С-терминальными и несут небольшой отрицательный заряд. Таким образом, ион удерживается в сайте за счет электростатического поля, образованного концами поровых спиралей. Две другие спирали, входящие в состав субъединицы канала, также представляют собой диполи, N-конец которых заряжен положительно, а С-конец – отрицательно. Однако электростатический эффект от этих спиралей небольшой в связи с тем, что они расположены антипараллельно [3].

Стенки водной полости KcsA образованы четырьмя М2 спиралями. Ион калия, входящий в полость канала из цитоплазмы, не теряет гидратной оболочки. Таким образом, ион продолжает оставаться гидратированным, находясь, тем не менее, на уровне гидрофобной мембраны. Это представляет собой одну из стратегий проведения ионов через гидрофобный барьер – образование водных полостей (шунтов). Вторую стратегию используют ионные переносчики – увеличение радиуса ионов в мембране.

Нижнее преддверие канала (его стенки также образованы М2 спиралями) – это главные ворота, через которые ион входит в полость, заполненную водой. Внутриклеточное положение ворот канала было продемонстрировано экспериментально: на белок действовали различными лигандами, имеющими сайт связывания с цитоплазматической стороны; эффект от связывания лигандов был различным в

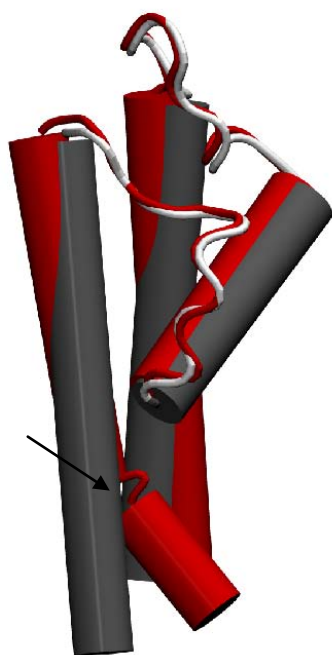
зависимости от того был ли канал закрыт или открыт. Закрытые ворота образуют гидрофобное кольцо (гидрофобные аминокислотные остатки - лейцины), через которое ион не может проникнуть в канал. Во время открытия канала радиус поры на уровне нижнего преддверия увеличивается, в результате ион свободно может проходить в мембрану.

Среди неразрешенных профессором MacKinnon структурных элементов KcsA – N- и C-терминальные домены. N-терминальный домен образован  $\alpha$ -спиралями, заякоренными в мембрану; C-терминальный домен образован пучком  $\alpha$ -спиралей длиной 70 Å, расположенным перпендикулярно мембране [4].

### **1.1.2. Закрытая и открытая структуры KcsA. Теоретические методы построения открытой структуры. Экспериментальное получение открытой структуры.**

Радиус поры в области внутриклеточных ворот для структуры KcsA, полученной профессором MacKinnon в 1998 году, 2 Å, не значительно превышает радиус иона калия, 1.33 Å, и меньше радиуса гидратированного иона калия на 2.3 Å. На уровне главных ворот иону не выгодно снимать гидратную оболочку в связи с тем, что энергию дегидратации нечем компенсировать. Таким образом, ион будет проходить через ворота данной структуры канала неэффективно. Теоретически можно предположить, что радиус поры может временно увеличиваться до размера гидратированного иона за счет тепловых флуктуаций. С помощью метода молекулярной динамики системы калиевый канал в мембране было показано, что средний радиус поры на уровне главных ворот равен 1 Å, а размер тепловых флуктуаций составляет 0.4 Å [7]. Таким образом, согласно расчетам максимальный радиус поры на уровне главных ворот составляет 1.4 Å, что в свою очередь меньше радиуса гидратированного иона. Ион тетраалкиламмония блокирует калиевый ток, связываясь с каналом со стороны цитоплазмы. Блокатор входит в водную полость через главные ворота и закупоривает пору канала. Следовательно, размер радиуса поры должен быть не меньше чем размер иона блокатора. Радиус тетраэтиламмония, самого маленького блокатора из ряда тетраалкиламмония, равен 4.6 Å, что больше радиуса поры на уровне главных ворот для полученной структуры. Наконец методами спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (далее ЭПР) и сайт-направленного спин-мечения было показано, что пора канала на уровне главных ворот должна значительно увеличиваться во время проведения ионного тока. Таким образом, структура, разрешенная профессором MacKinnon, является структурой KcsA в закрытом неактивном состоянии.

Группой профессора Perozo на основе данных ЭПР было показано, что во время открытия канала внутренние спирали, M2, сгибаются на уровне 107T и 108A и поворачиваются относительно оси симметрии канала: на  $8^\circ$  относительно оси OZ, на  $8^\circ$  относительно плоскости XY, на  $30^\circ$  относительно собственной оси спирали, против часовой стрелки, если смотреть со стороны внешней среды (Рисунок 2). Также были получены относительные координаты C $\alpha$ -атомов M2-спиралей, соответствующие открытой структуре канала (для проходящего иона отсутствует энергетический барьер на уровне M2-спиралей) [8].



**Рисунок 2: Закрытая и открытая структуры белка (одна субъединица из четырех).**

Закрытая структура канала изображена серым цветом, открытая структура изображена красным цветом. Закрытая структура обрезана до количества остатков в открытой структуре. Стрелочкой отмечена область шарнира. Структуры были выровнены в программе VMD.

До экспериментального получения открытой структуры KcsA исследователями-теоретиками были предприняты многочисленные попытки получить данную структуру теоретически, в том числе с помощью методов молекулярного моделирования. Одним из подобных методов является направленная молекулярная динамика. В ходе построения используются данные закрытой структуры и структуры, полученной методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (далее ЯМР). В программе задается следующий алгоритм: C $\alpha$ -атомы внутренних спиралей канала привязываются гармоническим потенциалом к подвижным точкам. Данные точки с заданной скоростью движутся к координатам, соответствующим положению C $\alpha$ -атомов открытой структуры канала, полученной методом ЭПР. По истечению времени расчета траектории внутренние и внешние спирали оказываются раздвинуты и соответствуют открытой конформации канала, а область СФ остается прежней и соответствует закрытой конформации канала [9].

Второй метод, позволяющий получить открытую структуру KcsA in silico - это метод управляемой молекулярной динамики. В полости канала выращивается ван-дер-ваальсовый шарик, который задается таким образом, что только структурные элементы белка, но не вода или ионы, могут чувствовать его влияние. Взаимодействие белка и

шарика описываются потенциалом Леннарда-Джонса. Конечный радиус ван-дер-ваальсова шарика выбирается в соответствии со значением радиуса поры открытого канала на уровне главных ворот. В начальный момент времени радиус шарика равен нулю, далее по ходу траектории молекулярной динамики он увеличивается до выбранного значения. В конечный момент времени расчета исследователь получает новую структуру канала с увеличенной порой на уровне главных ворот [10, 11].

MthK – кальций-зависимый калиевый канал, выделенный из генома бактерии *Methanobacterium thermoautotrophicum*. KvAP – потенциал-зависимый калиевый канал, выделенный из генома бактерии *Aeropyrum pernix*. Структуры этих каналов в открытом состоянии были получены методом рентгеноструктурного анализа и были использованы для создания открытого KcsA по методу моделирования по гомологии (третий метод). Согласно данному методу, если для аминокислотных последовательностей белков после выравнивания степень гомологии не меньше 30-35%, то можно утверждать, что 3D структуры белков похожи [12]. Аминокислотные последовательности KcsA, MthK и KvAP характеризуются высокой степенью гомологии. Для построения трехмерной структуры белка по методу моделирования по гомологии существуют специальные программы, среди которых одной из самых известных является Modeller<sup>1</sup>. Используя данную программу, группой исследователей была получена открытая структура KcsA на основе имеющихся закрытой структуры данного канала и открытой структуры MthK [13].

Открытие главных ворот KcsA происходит при увеличении концентрации протонов в цитоплазме, о чем будет подробно рассказано в следующем разделе. Основываясь на приведенном факте, группой исследователей с помощью метода Monte-Carlo normal mode following method была построена структура KcsA с ионизированными С-терминальными остатками, соответствующая открытому состоянию канала [6].

Наконец, в 2010 году группе профессора Perozo удалось разрешить несколько различных открытых структур KcsA, отличающихся величиной радиуса поры на уровне главных ворот. Согласно автору получение сразу нескольких различных структур канала при одинаковых условиях эксперимента может быть обусловлено отсутствием барьера на пути движущихся внутренних спиралей. Это означает, что небольшие флуктуации во времени начала нуклеации белкового кристалла могут привести к набору структур, отличающихся степенью раскрытия поры [14].

---

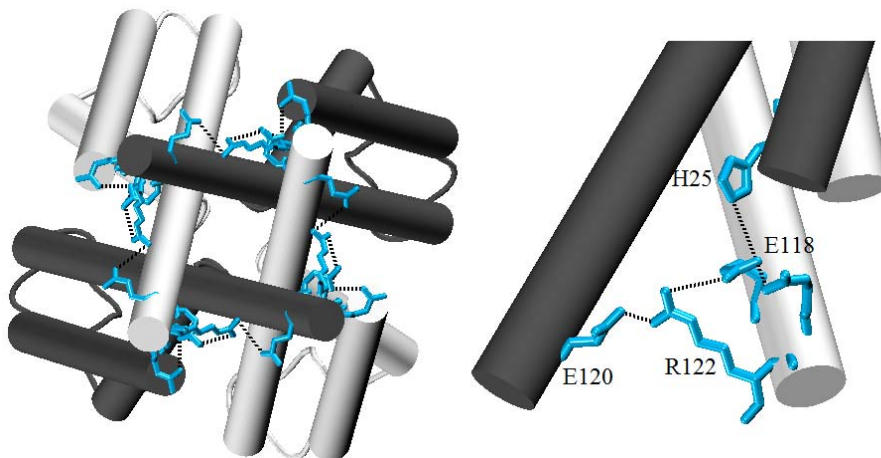
<sup>1</sup> <http://salilab.org/modeller/>

### **1.1.3. Условия открытия KcsA. Ключевые аминокислотные остатки, ответственные за открытие калиевого канала при снижении pH среды.**

Открытие главных ворот KcsA было продемонстрировано на искусственной системе сначала методом ЭПР и затем при наблюдении за золотыми нанокристаллами при снижении pH среды, в которую обращены С-терминальные остатки внутренних спиралей, до 5.5. Многие ионные каналы реагируют на изменение концентрации протонов в цитоплазматической среде, среди них рецепторы переходящих потенциалов TRP, кислоточувствительные ионные каналы ASIC, калиевые внутренние выпрямляющие каналы KIR, хлорные каналы CLC, рецепторы N-метил-D-аспартата NMDA. При снижении pH среды происходит сдвиг равновесия в реакции диссоциации ионизируемых аминокислотных остатков. В случае кислых остатков (глутамат, аспартат) после увеличения концентрации протонов в среде преобладающей формой будет нейтральная и, наоборот, при уменьшении концентрации протонов в среде преобладающей формой будет заряженная. В зависимости от наличия или отсутствия заряда на аминокислотных остатках они либо будут участвовать в образовании водородных связей, либо не будут. Ранее было высказано предположение, что поддержание стабильности закрытой структуры канала обеспечивается сетью водородных связей, образованных аминокислотными остатками на уровне главных ворот, а также отсутствием близкорасположенных одноименно заряженных остатков. pKa ключевых остатков определяет диапазон pH, при котором происходит изменение состояния канала (переключение между открытым и закрытым состояниями), т.к. их переход из заряженной формы в нейтральную в условиях высокой концентрации протонов приводит к разрыву водородных связей, удерживающих внутренние спирали вместе, и/или к образованию близко расположенных одноименных зарядов [15].

Для KcsA характерно наличие десяти глутаматов и одного аспартата на С-терминальном домене, pKa которых около 5.5. Из них вероятно только два (E118 и E120) образуют отдельный сенсор pH, остальные девять находятся за F125, т.е. входят в состав цитоплазматической части KcsA, которая обладает собственным pH-сенсором. Точечные мутации E118 и E120, а именно их замена на неполярные остатки, например на аланин, приводят к сдвигу диапазона pH-чувствительности канала в сторону увеличения pH. неполярные аминокислотные остатки не могут образовывать водородных связей, необходимых для удержания пучка внутренних спиралей вместе, поэтому в случае точечных мутаций канал оказывается открытым и при высоких значениях pH. Ранее,

пользуясь расчетами по методу Монте Карло, исследователи Miloshevsky и Jordan также показали, что ключевыми остатками, ответственными за чувствительность к различной концентрации протонов, являются E118 и E120.



### **Рисунок 3: рН-сенсоры калиевого канала KcsA.**

Голубым цветом обозначены ключевые аминокислотные остатки, участвующие в формировании рН-сенсора калиевого канала. Водородные связи образуются между остатками E120 и R122, E118 и R122, E118 и R121, H25 и E118. См. пояснения в тексте.

В случае основных остатков (гистидин, аргинин, лизин) после увеличения концентрации протонов в среде преобладающей формой будет заряженная. Если такие остатки расположены рядом друг с другом или рядом с положительно заряженным остатком, то при снижении pH возникнет дисбаланс сил, обусловленный электростатическим отталкиванием возникших одноименных зарядов. Данный дисбаланс в свою очередь приведет к релаксации системы в новое состояние, соответствующее открытому каналу. Другими словами взаимодействие между находящимися на разных субъединицах канала основными остатками, заряженными положительно, приводит к расхождению внутренних спиралей и открытию поры канала.

Методом ЯМР было показано, что H25, находящийся на внешней спирали субъединицы, является рН-сенсором. При замене гистидина на аргинин, который заряжен положительно и при низких концентрациях протонов в среде, диапазон pH-чувствительности канала сдвигается в сторону увеличения pH. Расхождение внутренних спиралей при появлении заряда на гистидине обусловлено двумя причинами: во-первых, электростатическим отталкиванием гистидина и двух остатков аргинина (R122 и R121), расположенных на внутренней спирали; во-вторых, увеличением гидрофильности среды в области аминокислотного остатка, которая по большей степени гидрофобна.

Таким образом, рН-сенсор ТМ части канала образован сетью водородных связей между остатками E120 и R122, E118 и R122, E118 и R121, H25 и E118 (Рисунок 3) [15].

Открытие KcsA в условиях высокой концентрации протонов в среде, в которую обращены главные ворота, было показано на искусственных системах, что было отмечено ранее. В цитоплазме живой клетки снижение уровня pH до 5.5 представляется маловероятным. Экспериментально было показано, что калиевый канал также может переключаться между двумя состояниями при условии высокого градиента ионов калия. Когда величины концентрации ионов калия сильно различаются по разные стороны мембраны (2.5:1), канал может переходить в открытое состояние. Предполагается, что в таком случае процессы открытия и закрытия канала регулируются силой взаимодействия ионов с С-терминальным участком канала и величиной потока ионов калия [16].

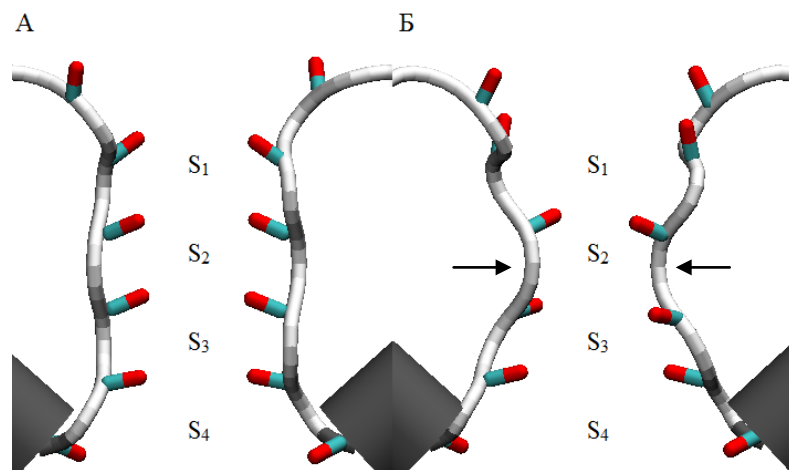
#### **1.1.4. Вторые ворота калиевого канала, расположенные на уровне СФ.**

##### **Типы инактивации KcsA. Схема работы калиевого канала по Chakrapani S. et al.**

Согласно первым экспериментам, проведенным на KcsA, вероятность перехода канала в активное состояние, при котором наблюдается ионный ток, низка даже при очень высокой концентрации протонов в среде. Несмотря на открытие главных ворот в данных условиях, которое было зарегистрировано для отдельного канала с помощью метода ЭПР, исследователи наблюдали слабый ионный ток, соответствующий малой доли каналов в активном состоянии. Позже оказалось, что после увеличения концентрации протонов в среде и последующего открытия главных ворот (временная константа – 15 мс) следует период инактивации канала (временная константа – 1-3 с) и затем медленный выход из инактивированного состояния, вероятность которого очень мала и равна 10% [17]. Именно последнюю стадию работы канала – выход из инактивированного состояния – ранее наблюдали исследователи.

Кинетика инактивации KcsA аналогична кинетике С-типа инактивации. Данный тип инактивации характерен для потенциал-зависимых калиевых каналов, и подразумевает закрытие поры канала со стороны внешней среды [18]. Скорости инактивации KcsA и С-типа инактивации одинаково зависят от концентрации ионов калия во внешней среде и от типа проходящего иона: рубидий больше времени проводит в СФ по сравнению с калием и замедляет инактивацию канала. Ранее было показано, что для инактивации С-типа характерно изменение конформации СФ: в калиевых каналах типа Shaker изменяется конформация СФ и происходит сужение поры канала. Было сделано предположение, что наблюдаемая инактивация KcsA связана с подобными перестройками. Позже группой профессора Perozo было показано, что инактивация KcsA действительно

обусловлена сужением поры на уровне СФ, а именно на уровне  $S_2$  сайта связывания (Рисунок 4) [14]. Причиной изменения конформации СФ во время инактивации может быть недостаток ионного тока через него: условия таковы, что скорость выхода ионов из СФ больше скорости входа ионов через главные ворота [6].



**Рисунок 4: Структура СФ KcsA.**

А: Неинактивированный СФ. Б: Инактивированный СФ.  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$  – сайты связывания ионов калия. Стрелочками обозначена область сужения СФ.

Кинетика инактивации KcsA зависит от значения потенциала на мембране: в условиях гиперполяризации инактивация наступает значительно быстрее, в условиях деполяризации доля активных каналов увеличивается с ростом напряжения на мембране. Скорость выхода из инактивированного состояния также модулируется напряжением: она увеличивается с ростом мембранного потенциала. Зависимость скорости инактивации от концентрации протонов в среде гораздо менее выражена. В диапазоне pH от 3.0 до 4.0 скорость инактивации не изменяется, в диапазоне pH от 4.0 до 5.0 (соответствует переходу KcsA между открытым и закрытым состояниями) наблюдается слабое уменьшение скорости инактивации с ростом pH. Наличие зависимости скорости инактивации от pH в диапазоне 4.0 – 5.0 вероятно обусловлено механической связью процесса инактивации на уровне СФ с процессом открытия главных ворот канала.

Инактивация KcsA может происходить из открытого, частично открытого и закрытого состояний канала, а выход из инактивированного состояния происходит в основном из закрытого состояния. Время пребывания в закрытом состоянии, необходимое для дальнейшего восстановления тока – не менее 500 мс [19].

Полученные ранее данные для совокупности каналов (зависимость инактивации от напряжения на мембране, pH, ионного тока) были подтверждены в экспериментах на единичных каналах. Эти эксперименты, в том числе, позволили исследовать различные

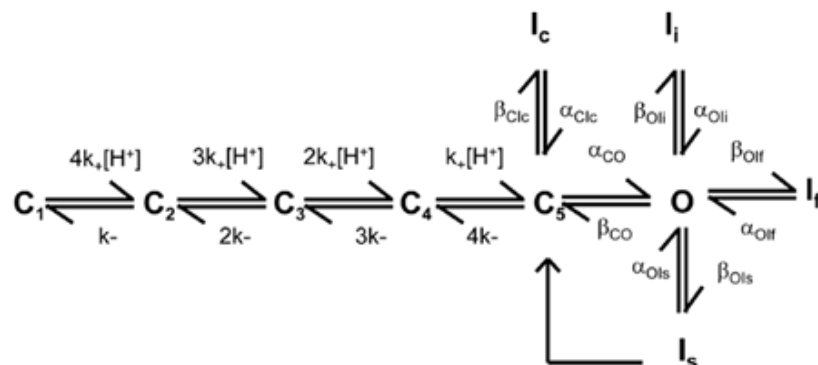


состояния KcsA [20]. Для единичного калиевого канала было обнаружено несколько мод проводимости в условиях открытых главных ворот и отсутствия С-типа инактивации, отличающихся средними временами жизни открытого и закрытого состояний. Модальное поведение KcsA – это результат динамики СФ, т.к. при внесении мутаций в область СФ происходит изменения в их кинетике. Дальнейший анализ экспериментальных данных показал, что наблюдаемая кинетика отражает переход KcsA между тремя различными состояниями, два из которых – канал в неактивном состоянии ( $I_i$  и  $I_f$ ), а одно – канал в активном состоянии (О). Время жизни KcsA в  $I_i$  и  $I_f$  – 0.2-0.5 мс и 2-5 мс, соответственно, и не зависит от концентрации протонов в среде. Для О, напротив, существует небольшая зависимость от pH.

Работу канала можно представить следующим образом: однажды открывшись, KcsA может переходить между различными состояниями, которые со временем переходят в инактивированное состояние по С-типу ( $I_s$ ). При возрастании напряжения на мембране происходит увеличение времени жизни KcsA между двумя  $I_s$  в основном за счет увеличения времени жизни О. Времена жизни  $I_i$  и  $I_f$  также увеличиваются под действием напряжения. В результате гиперполяризации время жизни О уменьшается и также уменьшается время жизни KcsA между двумя  $I_s$ . Согласно существующему предположению изменение времени жизни активного состояния KcsA при различных значениях напряжения на мембране обусловлено изменением вероятности блокирования KcsA ионами в растворе.

Группой профессора Perozo была предложена схема работы KcsA (Рисунок 5). Согласно предложенной схеме открытие главных ворот канала представляется как переход между пятью различными закрытыми состояниями и выход в состояние открытого канала.  $C_1$  соответствует закрытому состоянию с четырьмя депротонированными субъединицами,  $C_2$ ,  $C_3$  и  $C_4$  соответствуют закрытому состоянию с тремя, двумя и одной депротонированной субъединицей,  $C_5$  соответствует закрытому состоянию, где все четыре субъединицы протонированны. Константы равновесия в реакциях, соответствующих переходам между пятью закрытыми состояниями, зависят от концентрации протонов в среде. Для описания работы KcsA исследователи пренебрегли эффектом кооперативности при открытии главных ворот канала. Открытое состояние KcsA является метастабильным и со временем переходит в инактивированное состояние ( $I_s$ ). До выхода в инактивированное состояние KcsA переходит между тремя различными состояниями (О,  $I_i$ ,  $I_f$ ). KcsA может инактивироваться из закрытого состояния ( $I_c$ ). Выход из инактивированного состояния может происходить из открытого состояния с

вероятностью 10% и через закрытое состояние канала. Стадии входа и выхода из инактивированного состояния, а также перехода между активным и неактивными состояниями зависят от напряжения на мембране [20].



**Рисунок 5: Схема работы KcsA по Chakrapani S. et al. Открытие/закрытие канала, переход в инактивированное состояние.**

$C_1$  – закрытое состояние канала, все субъединицы депротонированы;  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$  – закрытые состояния канала с одной, двумя, тремя, четырьмя протонированными субъединицами;  $O$  – открытое состояние канала,  $I_c$ ,  $I_i$ ,  $I_s$  – инактивированные состояния канала.  $k$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  – константы скорости реакции. См. пояснения в тексте.

#### **1.1.5. Карбоксилат-карбоксилатный мостик между остатками E71 и D80, расположенными на уровне СФ. Зависимость проводимости KcsA от состава липидной мембраны.**

При исследовании проводимости единичных мутантов, было обнаружено, что E71/A71 не подвержен инактивации С-типа. В структуре KcsA E71 расположен в поровой спирали, за СФ и развернут в сторону D80 (Рисунок 1Б). В связи с близким расположением двух кислых остатков и далее на основе молекулярно-динамического расчета было предположено, что один из них должен находиться в протонированном состоянии, другой должен быть заряжен, а между ними должна образовываться карбоксилат-карбоксилатная связь. Далее было показано, что от силы данной связи зависит скорость вхождения канала в инактивированное состояние: чем связь сильнее, тем скорость инактивации больше, и наоборот. Так, при замене глутамата на гистидин KcsA большую часть времени находится в инактивированном состоянии, в то же время при замене глутамата на аланин или валин KcsA вообще не переходит в инактивированное состояние [14].

С помощью метода сайт-направленного мутагенеза можно определить сенсор напряжения калиевого канала. Исследователями было получено несколько мутантных форм KcsA по ионизированным остаткам, находящимся в ТМ области. На полученных мутантах исследовали зависимость проводимости от напряжения. Оказалось, что при

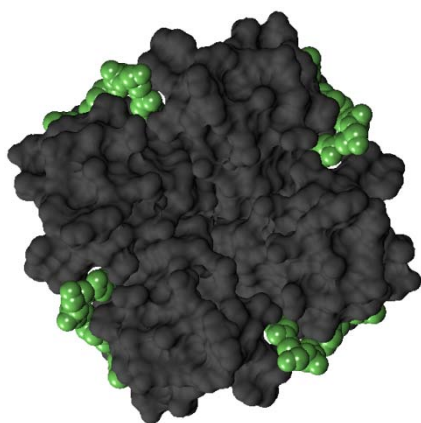
замене E71 на гидрофобный остаток эта зависимость полностью утрачивается. Следовательно, данный аминокислотный остаток также является сенсором напряжения в KcsA.

С помощью метода молекулярной динамики было показано, что E71 участвует в образовании сети водородных связей (G77, Y78, V76, молекула воды, R89) и через нее взаимодействует с СФ, поддерживая его структуру. В условиях деполяризации боковая группа E71 поворачивается в сторону внутренней среды, вследствие чего нарушается карбоксилат-карбоксилатная связь между E71 и D80. Неспособность KcsA инактивироваться в условиях деполяризующего напряжения на мембране следует из изменения конформации СФ, происходящей при разрыве карбоксилат-карбоксилатной связи и нарушении сети водородных связей, о которой было сказано ранее [21].

Какой из остатков, E71 или D80, заряжен, а какой протонирован? Согласно данным, полученным экспериментально, при нейтрализации D80 происходит изменение стабильности структуры белка, а при нейтрализации E71 помимо изменения стабильности структуры изменяется и проводимость канала. При моделировании KcsA чаще принимают, что E71 протонирован, а D80 заряжен. Однако есть работы, в которых исследователи предполагают, что именно остаток аспартата в этой связи должен быть нейтральным [21]. По данным молекулярной динамики модель канала с E-H/D лучше воспроизводит структурные данные в отличие от модели с E/D-H: во втором случае теряется связь аспартата с аргинином, наличие которой было подтверждено ранее. В квантовой молекулярной динамике протон описывается подвижным, т.е. может переходить от одного остатка к другому в ходе расчета. Такое представление системы является наиболее оптимальным. Так с помощью метода QM/MM (совмещение квантовой и классической молекулярной динамики) было показано, что переход протона между двумя остатками может оказывать влияние: на стабилизацию низко- или высокоаффинного состояния СФ по отношению к ионам, на зависимость проводимости KcsA от напряжения и т.д. Также было показано, что в перескоке протона с E71 на D80 и наоборот важную роль играет молекула воды, взаимодействующая через водородные связи с E71 и L81 [22].

Из экспериментальных данных известно, что KcsA активен только в мембране с анион-липидами, а вероятность открытия канала возрастает с увеличением процентного содержания анион-липидов в бислое. При увеличении содержания отрицательно-заряженных липидов в мембране с 25 до 100%, вероятность открытия KcsA возрастает с 2.5 до 62%, также растет амплитуда ионного тока через канал. В структуре KcsA,

полученной профессором MacKinnon, были также разрешены анион-липиды, находящиеся в нескольких сайтах связывания канала (между субъединицами белка, Рисунок 6). Данные сайты далее исследовали с помощью метода тушения флуоресценции. Было показано, что только анион-липиды, но не нейтральные липиды, могут входить в пространство между субъединицами белка и связываться с несколькими сайтами. Анион-липиды также могут взаимодействовать с кластерами положительно заряженных аминокислотных остатков (аргинин), расположенных рядом с главными воротами канала. Такое взаимодействие было показано, например, для механочувствительного канала MscL.



**Рисунок 6: Несколько сайтов связывания KcsA.**

Серым цветом обозначен калиевый канал KcsA, зеленым – анион-липиды. Липиды находятся в нескольких сайтах связывания. См. пояснения в тексте.

Возрастание амплитуды проводимости KcsA может быть обусловлено увеличением концентрации ионов калия около мембраны из-за наличия анион-липидов. Например, было показано, что при увеличении концентрации ионов калия в среде эффект от присутствия анион-липидов уменьшается. Несколько сайтов связывания анион-липидов находятся в непосредственной близости от СФ. Возможно, изменение активности канала опосредованно влиянием отрицательно-заряженных липидов на процесс инактивации СФ по С-типу. Так, при наличии анион-липидов в мембране скорость инактивации канала уменьшается, и наблюдается высокая вероятность открытия KcsA. Состав мембраны *S. lividans*, бактерии, из генома которой был выделен KcsA, до сих пор детально не изучен, однако известно, что, в общем, для рода *S.* характерно содержание отрицательно-заряженных кардиолипидов в мембране [23].

Методом рентгеноструктурного анализа были разрешены структуры мутантных KcsA, у которых аминокислотный остаток E71 заменен на аланин. Для одной из полученных структур было показано, что карбонильная группа V76 из характерной последовательности СФ одной субъединицы, развернута в сторону противоположную пору канала. Поворот карбонильной группы V76 также наблюдали в ходе 2 нс

молекулярной динамики системы с немутантным каналом. Теоретически, если атом кислорода карбонильной группы СФ значительно изменит свое положение, например, повернется на 180° относительно пептидной связи, то нарушится структура сольватной оболочки для иона калия. Таким образом, иону будет не выгодно проходить через СФ, и тока через канал не будет. Возможно, перескок карбонильной группы V76 следует рассматривать как один из вариантов инактивации KcsA [24].

#### **1.1.6. Механическая связь между главными воротами и СФ канала.**

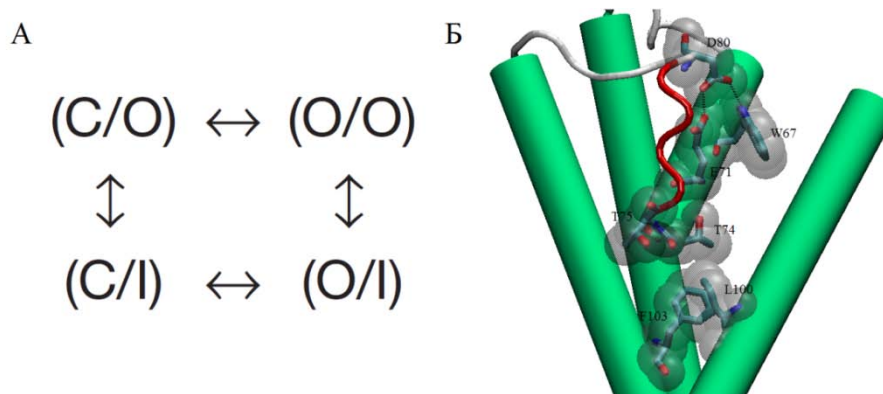
##### **Схема работы KcsA по Cuello L. et al.**

Функциональное поведение большинства ионных каналов определяется отношением между двумя важнейшими процессами: активацией и инактивацией ворот. Активация определяется как крупномасштабное движение внутренних спиралей в ответ на внешний стимул, напротив, инактивация обычно происходит независимо от стимула, однако она связана с процессом активации.

Инактивация KcsA по С-типу приводит к сужению СФ на уровне S<sub>2</sub> сайта за счет поворота G77 внутрь поры канала. В зависимости от степени разворота остатка СФ может находиться в двух состояниях: с тремя или с двумя ионами в нем. Структура канала с двумя ионами калия на уровне СФ соответствует полностью инактивированному состоянию канала и не способна проводить ионы. С другой стороны структура с тремя ионами калия в S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub> и S<sub>4</sub> сайтах связывания может проводить ионы и соответствует частично инактивированному состоянию. Структура СФ в полностью инактивированном состоянии напоминает таковую в условиях низкой концентрации ионов калия. Однако между ними имеется несколько существенных различий: в инактивированной структуре нет электронной плотности на уровне S<sub>3</sub> сайта связывания, в этой же структуре нижнее преддверие СФ более расширено и также отличается угол наклона поровой спирали [14].

Взаимодействие главных ворот и СФ было показано экспериментально. В среде с ионами рубидия и цезия, которые, проходя через СФ, задерживаются в нем дольше, чем ионы калия, скорость закрытия главных ворот меньше. При введении точечных мутаций в последовательность СФ канала изменяется вероятность открытия ворот. Блокирование канала со стороны главных ворот приводит к возрастанию скорости инактивации на уровне СФ. Данное взаимодействие также было показано с помощью метода ЭПР: открытие главных ворот канала приводит к изменению конформации поровой спирали и внешнего преддверия. На основе экспериментальных данных группой профессора Perozo была предложена схема взаимодействия двух структурных элементов канала (Рисунок 7А)

[25]. Открытие главных ворот стабилизирует инактивированное состояние СФ. Переход СФ в инактивированное состояние приводит к закрытию главных ворот канала. Когда главные ворота канала закрыты, СФ с некоторой вероятностью может выходить из инактивированного состояния. Наконец, завершающий этап – открытие главных ворот канала под действием внешнего стимула, увеличения концентрации протонов в среде.



**Рисунок 7: Механическая связь между главными воротами и СФ канала.**

А: Схема работы KcsA, по Cuello L. et al. С – закрытое состояние канала, О – открытое, I – инактивированное. Б: Ключевые аминокислотные остатки, участвующие во взаимосвязи главных ворот канала и СФ. См. пояснения в тексте.

Взаимодействие главных ворот и СФ – происходит за счет стерических взаимодействий между соответствующими остатками. Его можно описать следующим образом (схема была разработана на основе экспериментальных данных и результатов молекулярной динамики, Рисунок 7Б): вращение и излом внутренних спиралей канала приводит к тому, что ароматическое кольцо F103 сгибается в сторону T74 и T75 (входят в состав поровой спирали) и L100 (находится на соседней субъединице). В результате сеть водородных связей между остатками W67, E71 и D80 нарушается, и СФ входит в инактивированное состояние. Экспериментально было показано, что при замене F103 на остаток с меньшей боковой группой вероятность входа канала в инактивированное состояние уменьшается, и, наоборот, при замене F103 на остаток с большей боковой группой, канал оказывается инактивированным большую часть времени [25].

С-терминальный домен KcsA также оказывает влияние на кинетику активации и инактивации канала. В эксперименте было показано, что канал с отсутствующим С-терминальным доменом быстрее инактивируется и с малой вероятностью выходит из этого состояния, однако вероятность открытия главных ворот увеличивается.

### **1.1.7. Изучение проводимости калиевых каналов теоретическими методами: броуновская и молекулярная динамика. Общие принципы проведения ионов через KcsA.**

Значение проводимости KcsA было получено экспериментально и составляет от  $10^7$  до  $10^8$  ионов в секунду по разным литературным источникам. Далее приведены данные, полученные для KcsA в трех экспериментальных работах: 1) 135 пкСм, 200 мМ KCl, 100 мВ [26]; 2) 97 пкСм, 250 мМ KCl, 100 мВ [27]; 3) 83 пкСм, 100 мМ KCl, 100 мВ [28]. В среднем на прохождение одного иона калия через мембрану затрачивается 20 нс при концентрации соли калия 150 мМ и напряжении внешнего поля 100 мВ.

Помимо экспериментальных методов проводимость канала можно изучать теоретически с помощью методов броуновской и молекулярной динамики. В методе броуновской динамики система описывается грубо, поэтому для нее можно рассчитывать относительно долгие траектории (микросекундный диапазон). С помощью данного метода группой исследователей была построена вольтамперная характеристика KcsA, которая находилась в хорошем согласии с экспериментом [10]. Предварительно этой же группой с помощью управляемой молекулярной динамики была создана модель открытого KcsA, и далее на основе полученной модели были произведены расчеты проводимости канала с помощью броуновской динамики. В той же работе исследователи смотрели зависимость проводимости KcsA от величины заряда на ионизируемых остатках. Было показано, что максимальная проводимость канала достигается, когда остаток E71 протонирован, ионизируемые остатки, обращенные во внешнюю среду, полностью заряжены, а ионизируемые остатки, обращенные в цитоплазму, нейтральны. Также в работе приведен график профиля свободной энергии иона калия в KcsA, согласно которому в отсутствии внешнего электростатического поля в калиевом канале в равновесии находятся три иона, два из которых в СФ, и один в водной полости. В условиях внешнего поля ионы калия из раствора входят в полость канала, форма профиля свободной энергии изменяется, и барьер, препятствующий выходу ионов калия из СФ во внешнюю среду, уменьшается [10].

Общий принцип проведения ионов калия через KcsA был разработан на основе теоретических и экспериментальных данных. Так, на уровне СФ ионы проходят по принципу single-file, или одной колонной: во время проведения образуется один ряд частиц, состоящий из ионов калия и молекул воды. Далее с помощью рассчитанных профилей свободной энергии был предложен механизм проведения ионов. Было показано, что в отсутствии внешнего поля ионы большую часть времени находятся в  $S_4$  и  $S_2$  сайтах

связывания СФ. При появлении на мембране напряжения ионы из раствора начинают входить в полость канала. Процессом, лимитирующим скорость проведения на данном этапе, является диссоциация иона из сайта  $S_{ext}$ . Диссоциация иона из  $S_{ext}$  существенно снижает энергетический барьер для проведения ионов по направлению к внешней среде. Существует два механизма дальнейшего продвижения ионов через калиевый канал. Согласно первому СФ большую часть времени находится в  $S_4/S_2$  состоянии. Когда ион из раствора входит в полость канала, энергетический барьер между  $S_4/S_2$  и  $S_3/S_1$  состояниями снижается до 1 ккал/моль. Ионы на уровне СФ спонтанно переходят в  $S_3$ ,  $S_1$  сайты связывания, а ион, находящийся в полости подходит к СФ. Образуется переходное состояние с двумя ионами на уровне СФ и одним ионом во внутреннем преддверии СФ. Согласно второму механизму ионы, находящиеся в СФ, в условиях внешнего поля могут самостоятельно переходить в  $S_3$  и  $S_1$  сайты связывания, образуя вакантный сайт для иона, входящего в полость канала из раствора. Таким образом, оба механизма приводят к переходному состоянию с двумя ионами на уровне СФ и одним ионом во внутреннем преддверии СФ. За счет того, что есть третий ион, который пытается войти в СФ, энергетический барьер между сайтами  $S_1$  и  $S_0$  уменьшается и передвижение ионов из  $S_3/S_1$  в  $S_2/S_0$  становится возможным;  $S_4$  сайт заполняется ионом, вошедшим в СФ из полости канала. Механизм прохождения ионов через пору калиевого канала, когда для продвижения ионов в СФ к его внутреннему преддверию должен подойти третий ион, называется knock-on. Также на основе рассчитанного профиля свободной энергии было предсказано существование двух сайтов связывания во внешней среде –  $S_0$  и  $S_{ext}$ . В последствии данное предсказание было подтверждено, когда была получена структура KcsA с высоким разрешением [29].



## 1.2. Метод изучения: молекулярная динамика.

В данной части раздела «Обзор литературы» приведено описание классического метода молекулярной динамики, метода Adaptive Biasing Force, используемого для измерения свободной энергии. В заключении приведены основные принципы моделирования KcsA, которые применяются исследователями-теоретиками на данный момент.

### 1.2.1. Метод классической молекулярной динамики. Представление системы в виде совокупности материальных точек. Вклады в потенциальную энергию. Силовые поля.

Классический метод молекулярной динамики основывается на следующем принципе: реальный молекулярный объект представляется в виде системы взаимодействующих материальных точек. Каждая материальная точка характеризуется тремя величинами – массой  $m_i$ , координатой  $r_i$ , скоростью  $v_i$ . Движение атомов описывается классическими законами Ньютона:

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i, \quad \frac{dr_i}{dt} = v_i, \quad i = 1, \dots, N,$$

где  $N$  – число атомов в системе,  $m_i$  – масса  $i$ -ого атома,  $F_i$  – сила, действующая на атом с номером  $i$ . Данное приближение хорошо работает, если частоты колебаний материальных точек не превышают величину  $k_b T/h$ , где  $k_b$  – постоянная Больцмана,  $T$  – температура,  $h$  – постоянная Планка. В противном случае для описания системы следует использовать уравнения квантовой физики.

Согласно определению сила, действующая на материальную точку, есть отрицательный градиент потенциальной энергии:

$$F_i = - \frac{\partial U(r_1, \dots, r_N)}{\partial r_i}.$$

Таким образом, заданная функция потенциальной энергии полностью определяет взаимодействия между частицами. Потенциальная энергия системы складывается из нескольких вкладов, или термов: энергий валентных связей, валентных углов, торсионных углов, плоских групп, ван-дер-ваальсовых и кулоновских взаимодействий:

$$U = U_{\text{bonds}} + U_{\text{angles}} + U_{\text{torsion}} + U_{\text{improper}} + U_{\text{vdW}} + U_{\text{qq}}.$$

Каждый терм в данной формуле определенным образом зависит от внутренних координат молекулярной системы: длин связей, величины валентных углов и т.д. Функциональный вид зависимостей и параметры взаимодействий выбираются из определенных физических соображений, чтобы добиться более точного воспроизведения тех или иных экспериментальных данных (спектральных, калориметрических, кристаллографических) или результатов квантово-химических расчетов для заданного набора химических соединений. К параметрам взаимодействий относятся геометрические параметры, парциальные заряды на атомах, энергетические характеристики взаимодействия (силовые константы). Данные параметры зависят от типов атомов и их различных сочетаний. Формулы и таблицы параметров, необходимые для вычисления потенциальной энергии молекулярной системы по координатам атомов, называются силовым полем.

Для силового поля AMBER, которое применяют для моделирования белков и нуклеиновых кислот, вклады, составляющие в сумме общую потенциальную энергию системы, выглядят следующим образом:

$$U_{bonds} = \sum_i K_{li} (l_i - l_0)^2,$$

$$U_{angles} = \sum_i K_{\theta i} (\theta_i - \theta_0)^2,$$

$$U_{torsion} = \sum_i K_{\varphi i} [1 \pm \cos(n_i \varphi_i)],$$

$$U_{improper} = \sum_i K_{\psi i} [1 - \cos(2\psi_i)],$$

где  $l_i$ ,  $\theta_i$ ,  $\varphi_i$ ,  $\psi_i$  – текущее значение длины валентных связей, величины валентных углов, торсионных углов и ложных торсионных углов соответственно;  $l_0$  и  $\theta_0$  – равновесное значение длины валентных связей и величины углов;  $K_{li}$ ,  $K_{\theta i}$ ,  $K_{\varphi i}$  и  $K_{\psi i}$  – силовые постоянные;  $n_i$  – целые числа, отражающие симметрию потенциалов соответствующих торсионных углов. Часто в формулу, описывающую потенциальную энергию системы, включают кросс-термы, отражающие связь между внутренними координатами. Далее приведен кросс-терм, описывающий зависимое изменение длин двух связей:

$$U_{stretch-stretch} = \sum_{i < j} \sum_j K_{li,lj} [(l_i - l_{i0})(l_j - l_{j0})],$$

где  $l_i, l_j$  – длины валентных связей,  $K_{li,j}$  – силовая постоянная,  $l_{i0}, l_{j0}$  – равновесные длины валентных связей. Обычно кросс-термы представляют собой функции от двух внутренних координат, реже используются кросс-термы, зависящие от трех координат.

Невалентные ван-дер-ваальсовы взаимодействия вычисляются между парами атомов, не связанных валентными связями или валентными углами, и задаются в виде модифицированного потенциала Леннарда-Джонса:

$$U_{vdw} = \sum_{i < j} \sum_j 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \cdot W_{vdw}(r_{ij}).$$

Здесь  $W_{vdw}(r_{ij})$  – функция переключения, гладко сводящая потенциал в ноль на участке  $[R_{on}, R_{off}]$ . Энергия электростатического взаимодействия описывается потенциалом:

$$U_{qq} = \sum_{i < j} \sum_j \frac{q_i q_j}{\varepsilon \cdot r_{ij}} \cdot W_{qq}(r_{ij}),$$

где  $r_{ij}$  – расстояние между частицами  $i$  и  $j$ ,  $q_i$  и  $q_j$  – парциальные заряды на атомах,  $\varepsilon$  – диэлектрическая проницаемость среды,  $W_{qq}(r_{ij})$  – экранирующая функция с радиусом  $R_q$ . Помимо заряд-зарядового взаимодействия для описания электростатики дополнительно используются термы заряд-дипольного, диполь-дипольного, заряд-квадрупольного, диполь-квадрупольного и др. взаимодействий. Следует отметить, что описание невалентных взаимодействий в виде суммы двухчастичных интегралов является приближением, т.к. в реальной системе наблюдаются эффекты, связанные с одновременным взаимодействием многих частиц и кооперацией [30-32].

### **1.2.2. Понятие свободной энергии как потенциала средней силы. Метод Adaptive Biasing Force.**

Свободная энергия – это один из термодинамических потенциалов, который, по сути, отражает вероятность найти систему в определенном состоянии при заданных условиях. Профиль свободной энергии для иона в канале можно вычислить через ее градиент, который равен отрицательной величине средней силы, действующей на ион:

$$-\nabla_j w = \langle F_j \rangle,$$

где  $\nabla_j w$  – градиент свободной энергии для координаты иона в канале,  $\langle F_j \rangle$  – средняя сила, действующая на данный ион. В свою очередь средняя сила, действующая на ион, рассчитывается по формуле:

$$\langle F_j \rangle = \frac{\int e^{-\beta U} (-\nabla_j U) dr_1 \dots dr_i \dots dr_N}{\int e^{-\beta U} dr_1 \dots dr_i \dots dr_N},$$

где  $\beta = 1/k_b T$ ,  $r_i$  – координата  $i$ -ой частицы,  $N$  – число частиц в системе.

Чтобы построить профиль свободной энергии системы исследователи применяют различные методы, позволяющие системе эффективно исследовать фазовое пространство. В данной работе был использован метод Adaptive Biasing Force (далее ABF). Алгоритм метода кратко заключается в следующем: программа предварительно оценивает среднюю силу, действующую на ион в определенной точке на оси канала. Далее в уравнение, описывающее движение данного иона, прописывается дополнительная сила. Она равна по модулю средней силе, рассчитанной программой ранее, и противоположна ей по знаку. Благодаря этому ион может преодолевать высокие энергетические барьеры и, таким образом, эффективно исследовать фазовое пространство. В течение времени расчета значение средней силы постоянно оптимизируется, и в конце исследователь получает профиль средней силы, из которого интегрированием можно вычислить профиль потенциала средней силы (далее ПСС), равный профилю свободной энергии с обратным знаком [33, 34].

### **1.2.3. Основные принципы моделирования калиевого канала KcsA.**

#### **Моделирование напряжения на мембране.**

Основу молекулярно-динамического эксперимента составляет модель выбранной структуры калиевого канала в ячейке с водой, ионами и гидрофобным слоем, имитирующим мембрану. Основным тип модели воды, используемый при расчете молекулярной динамики системы, - трехцентровая, в которой три сайта взаимодействия соответствуют трем атомам воды – кислороду и двум водородам. Концентрация соли KCl в воде обычно соответствует физиологическому значению концентрации калия в клетке (150 мМ), однако может быть любой в зависимости от цели производимого расчета, предоставленных временных и компьютерных ресурсов. В зависимости от цели расчета по-разному выбирается гидрофобный слой, имитирующий мембрану. Для исследования процессов открытия и закрытия канала удобно использовать систему с октановым слоем в качестве мембраны в связи с тем, что гидрофобные свойства октана аналогичны гидрофобным свойствам липидной мембраны, а вязкость октана меньше [35]. Таким образом, время диффузии белковых групп в октановой среде будет меньше, и, следовательно, меньше будет время, затраченное на расчет. Для исследования процессов,

не связанных с крупными конформационными перестройками, используют нейтральный липидный бислой (ДПФХ, ПОФХ). Согласно экспериментальным данным калиевый канал KcsA находится в проводящем состоянии, только будучи помещенным в мембрану с анион-липидами. Каким образом анион-липиды влияют на стабильность активного состояния KcsA остается неизвестным. Для моделирования процессов проведения ионов через пору калиевого канала необходимо решить проблему нестабильности проводящего состояния, поместив калиевый канал в мембрану с анион-липидами, или наложив ограничения на подвижность групп белка.

Исследователи моделируют потенциал на мембране с помощью двух различных подходов: 1) используют внешнее электростатическое поле [36, 37]; 2) моделируют систему с разной концентрацией ионов калия по разные стороны мембраны. Во втором случае, чтобы избежать выравнивания концентраций катионов из-за периодических граничных условий, в систему дополнительно вводят вторую мембрану или слой вакуума [38].

Для моделирования любого процесса, происходящего в системе, важно правильно выбрать параметры силового поля. Из-за эффектов индукции поляризации и переноса зарядов параметры силового поля для ионов калия, воды и аминокислотных остатков на уровне СФ могут иметь значения, отличные от стандартных. Более того они могут периодически изменяться в течение времени расчета молекулярной динамики системы. Такие изменения можно описать с помощью поляризуемых полей или квантовой молекулярной динамики [39-41].

## Глава 2

# Создание модели системы: калиевый канал KcsA в мембране

В разделе «Создание модели системы: калиевый канал KcsA в мембране» описаны структуры канала KcsA, представленные в белковой базе данных, мембрана, используемая для моделирования KcsA, кратко описан процесс создания моделируемой системы, приведены данные расчетов молекулярной динамики для системы с калиевым каналом в мембране.

### 2.1.1. Структуры KcsA, представленные в белковой базе данных. Программа HOLE. Подготовка структуры калиевого канала к молекулярной динамике.

В белковой базе было найдено несколько структур KcsA. Они соответствуют различным функциональным состояниям канала и отличаются диаметром поры на уровне главных ворот и структурой СФ. Согласно первому критерию (диаметр поры на уровне главных ворот) структуры разделяют на три группы: закрытые, открытые и частично открытые. Принадлежность разрешенной структуры к определенной группе обычно устанавливается авторами на основе измеренного диаметра поры и природы аминокислотных остатков, выстилающих пору на уровне главных ворот. Природа аминокислотных остатков является важным критерием, определяющим вероятность прохождения иона через ворота канала. Согласно расчетам по методу молекулярной динамики зависимость величины преодолеваемого ионом барьера на уровне ворот от диаметра поры не является линейной, а описывается сложной кривой. Форма кривой может сильно различаться в зависимости от того, гидрофобные или гидрофильные остатки выстилают пору. На основе структур, представленных в белковой базе данных, для проходящего через ворота иона калия были рассчитаны высоты энергетического барьера. Расчет проводился с помощью метода ABF, краткое описание которого приведено в обзоре литературы. Так, для закрытой структуры KcsA с радиусом поры на уровне главных ворот 2.5 Å высота барьера составляет 50 ккал/моль, для частично открытой структуры с радиусом поры 3.5 Å данная величина равна 22 ккал/моль. Для структур с радиусом поры на уровне ворот больше 5 Å высота энергетического барьера меньше 3 ккал/моль [42]. Такие структуры считаются полностью

открытыми на уровне главных ворот. По второму критерию (структура СФ) калиевый канал KcsA может быть инактивированным и неинактивированным. Основное различие между структурами СФ заключается в значении радиуса поры на уровне  $S_2$  сайта связывания. Практически состояние KcsA определяется по числу разрешенных ионов на уровне СФ: инактивированной считается структура с двумя ионами в  $S_4$  и  $S_1$  сайтах, неинактивированной считается структура с четырьмя ионами в  $S_4$ ,  $S_3$ ,  $S_2$  и  $S_1$  сайтах или с тремя ионами в  $S_4$ ,  $S_3$  и  $S_1$  сайтах [14].

На начальном этапе работы для нескольких структур KcsA с помощью программы HOLE<sup>2</sup> были построены профили радиуса поры. Для анализа были выбраны открытые, частично открытые и закрытые структуры, структуры с инактивированным и неинактивированным СФ. На входе программа HOLE запрашивает координатный файл pdb. Она считывает координаты атомов, их имена и имена остатков, к которым они принадлежат. На основе полученной информации каждому атому подбирается значение ван-дер-ваальсового радиуса из файла силового поля. В настоящей работе для построения профиля радиуса поры были использованы параметры силового поля AMBER99. Программа HOLE рассчитывает максимальный радиус сферы  $R(p)$ , которая центрирована в точке  $p$  на оси канала и не перекрывается со сферами, соответствующими атомам канала:

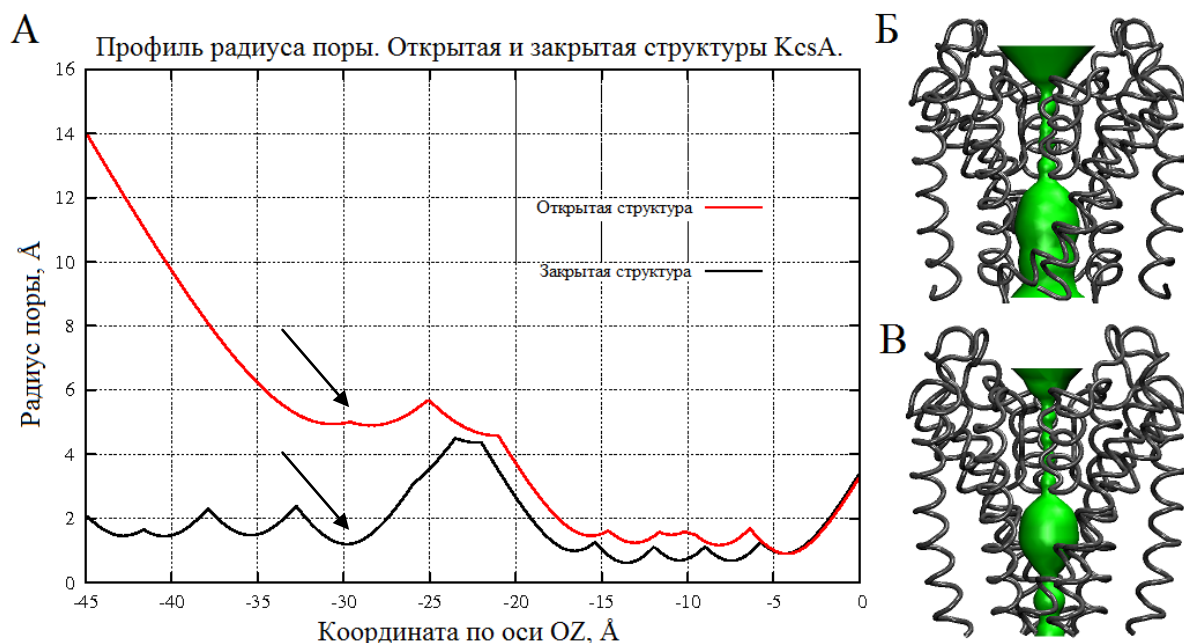
$$R(p) = \min_{i=1}^{Natom} [|X_i - p| - vdW_i],$$

где  $X_i$  – координата  $i$ -ого атома,  $vdW_i$  – ван-дер-ваальсовый радиус  $i$ -ого атома,  $Natom$  – число атомов, обращенных в пору канала. Данный расчет производится для серии плоскостей, перпендикулярных главной оси канала; шаг между плоскостями задается произвольно. На выходе программа выдает файл со значениями радиуса поры, по которым можно построить график профиля радиуса поры или визуализировать пору канала в программе VMD.

Далее приведены рассчитанные профили радиуса поры для различных структур калиевого канала. На рисунке 8 представлены данные для открытой и закрытой структур KcsA. По оси OX отложена координата точки на оси канала (нулевое значение соответствует  $S_0$  сайту связывания), по оси OY отложено значение радиуса поры. В закрытой структуре на уровне главных ворот минимальный радиус поры канала составляет 2.5 Å. Данной точке соответствует лейциновое гидрофобное кольцо, расположенное перед входом в полость канала, заполненную водой. Согласно

<sup>2</sup> <http://d2o.bioch.ox.ac.uk:38080/>

приведенным ранее данным по свободной энергии, высота энергетического барьера для иона калия в такой структуре должна быть около 50 ккал/моль. В открытой структуре радиус поры канала на уровне лейцинового гидрофобного кольца составляет 5 Å. По тем же данным энергетический барьер для проходящего иона калия в такой структуре должен быть не больше 3 ккал/моль.



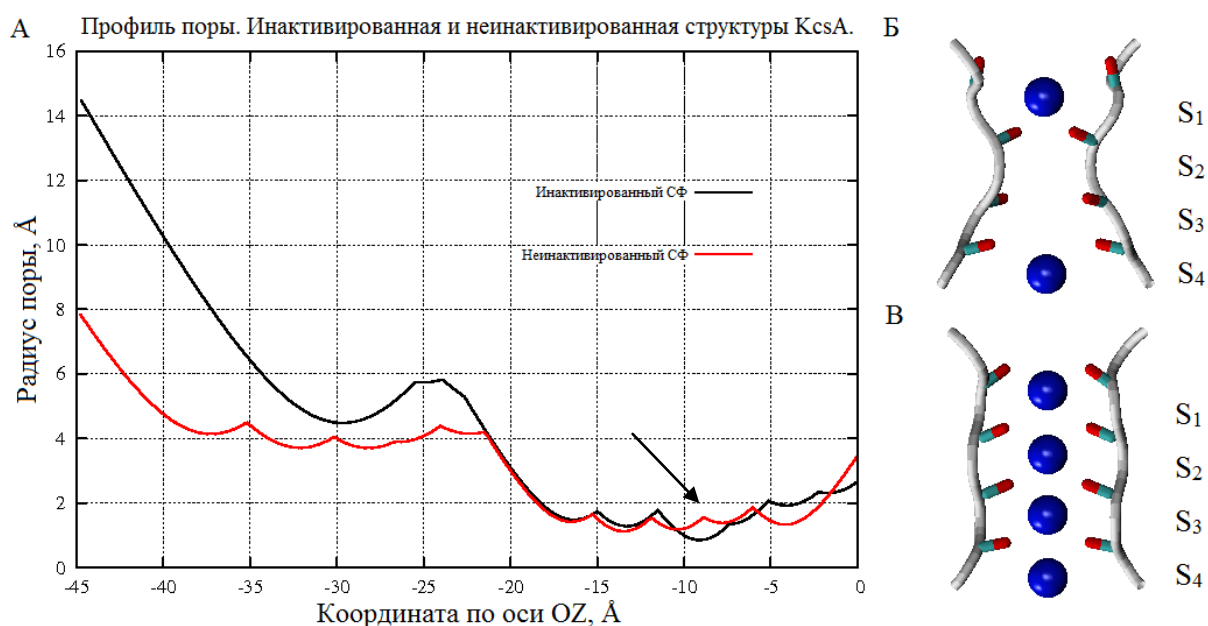
**Рисунок 8: Профиль радиуса поры. Открытая и закрытая структура KcsA.**

А: Профиль радиуса поры, построенный с помощью программы HOLE для открытой и закрытой структур KcsA. Красная кривая соответствует открытой структуре, черная – закрытой. Стрелочкой обозначена область лейцинового кольца (главные ворота канала). Б: Открытая структура. В: закрытая структура.

На рисунке 9 представлены данные для инактивированной и неинактивированной структур калиевого канала. Приведенные структуры KcsA различаются по значению радиуса поры на уровне  $S_2$  сайта СФ: для инактивированной структуры он составляет 0.88 Å, для неинактивированной структуры – 1.26 Å.

Для дальнейшего исследования процесса проведения ионов калия через канал была выбрана структура с pdb кодом 3fb7. Разрешение структуры составляет 3.3 Å, радиус поры на уровне главных ворот – 5 Å, структура соответствует неинактивированному состоянию канала. Данная структура заполнена ионами калия: три иона расположены в сайтах  $S_4$ ,  $S_3$  и  $S_1$  СФ и один в  $S_{cav}$ . Профиль радиуса поры выбранной структуры KcsA представлен на рисунке 8 (красная кривая).





**Рисунок 9: Профиль радиуса поры. Инактивированная и неинактивированная структуры KcsA.**

А: Профиль радиуса поры, построенный с помощью программы HOLE для инактивированной и неинактивированной структур KcsA. Красная кривая соответствует неинактивированной структуре, черная – инактивированной. Стрелочкой обозначен  $S_2$  сайт связывания. Б: Инактивированный СФ. В: Неинактивированный СФ.

Каждая из четырех субъединиц выбранной структуры KcsA состоит из 104 аминокислотных остатков. В процессе подготовки структуры к дальнейшей молекулярной динамике белковые цепи были дополнены заглушками: группами N-метиламина с N-конца и ацетильными группами с С-конца. Заглушки необходимы, так как концевые аминокислоты для данной структуры в реальном калиевом канале KcsA не свободны, а находятся в белковой цепи. В отсутствии заглушек на терминальных аминокислотных остатках будут дополнительные заряды. СФ и полость калиевого канала были заполнены ионами калия и молекулами воды с помощью программы VMD<sup>3</sup>. В полученной структуре канала два иона расположены в  $S_4$  и  $S_2$  сайтах, один ион находится в полости канала в  $S_{cav}$  сайте, молекулы воды расположены в  $S_3$  и  $S_1$  сайтах. Соответствующие координаты ионов и молекул воды в  $S_4$ ,  $S_{cav}$ ,  $S_3$  и  $S_1$  сайтах связывания были взяты из структурного файла 3fb7.pdb; положение иона в  $S_2$  сайте было рассчитано из известных координат частиц в  $S_3$  и  $S_1$  сайтах связывания. Полость калиевого канала была заполнена молекулами воды в ходе дальнейшей молекулярной динамики, описание которой будет приведено ниже. Данная структура KcsA была использована для моделирования процесса проведения ионов калия через канал под действием внешнего поля.

<sup>3</sup> <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>

Для расчета профиля свободной энергии одного иона калия в канале и триплета ионов в СФ на основе уже имеющихся траекторий молекулярной динамики были подготовлены следующие структуры KcsA: 1) канал с молекулами воды в сайтах  $S_4$ ,  $S_3$ ,  $S_2$ ,  $S_1$ ,  $S_0$  и с ионом калия при входе в главные ворота 2) канал с тремя ионами калия в сайтах  $S_4$ ,  $S_2$ ,  $S_0$  и двумя молекулами воды в сайтах  $S_3$ ,  $S_1$ .

Для описания модели калиевого канала использовались параметры силового поля AMBER03. Данное поле отличается от упоминавшегося ранее AMBER99 значениями парциальных зарядов на атомах аминокислотных остатков. Ионизируемые остатки KcsA были взяты в соответствии с их стандартным состоянием при нейтральном значении pH, за исключением E71. Он был взят протонированным согласно полученным теоретически и экспериментально данным, о которых было подробно рассказано в разделе «Обзор литературы».

### **2.1.2. Построение системы KcsA в фосфолипидной мембране. Модель мембраны ДПФХ. Программа G\_MEMBED. Результаты молекулярной динамики системы.**

В процессе подготовки структуры к дальнейшему молекулярно-динамическому расчету ее встраивали в гидрофобный слой, имитирующий свойства фосфолипидной мембраны. В простейшем случае в качестве компоненты гидрофобного слоя используют н-октан. Октан имитирует гидрофобные хвосты фосфолипидов. Он был успешно использован ранее для моделирования систем с трансмембранными белками [9, 13, 22, 24, 35, 39, 43-46]. По гидрофобным свойствам октановая мембрана напоминает фосфолипидную, однако вязкость октана меньше. В связи с этим октан часто используют для изучения процессов, в ходе которых происходят масштабные перемещения структурных элементов белка друг относительно друга, например, для изучения функционирования ворот канала.

Если исследуемый процесс не подразумевает масштабных перемещений структурных элементов трансмембранного белка друг относительно друга, то оптимальной моделью мембраны является фосфолипидный бислой. Несмотря на то, что KcsA – это бактериальный калиевый канал, большинство исследователей-теоретиков используют для моделирования эукариотические фосфолипидные мембраны. Наиболее часто используются ДПФХ [6, 29] и ПОФХ [7, 11, 13] мембраны. В настоящей работе была построена модель мембраны с липидами ДПФХ. Структурный файл с 64 молекулами

ДПФХ и водой был взят из базы данных университета Калгари<sup>4</sup>. Размер расчетной ячейки для моделирования канала был выбран на основе данных, известных из литературы. Он составляет  $96 \times 90 \times 90 \text{ \AA}^3$ , ячейка с такими размерами вмещает около 260 молекул фосфолипида. Размер уравновешенной ячейки с липидами модифицировали в программе BiLayer: ячейку увеличивали в два раза в ОХ и ОУ направлениях.

Липиды были описаны в тяжелоатомном приближении. Параметры силового поля и формулы для описания динамики торсионных углов были взяты из статьи Berger et al и Ruckaert и Bellemans соответственно [47-49].

Построенную модель мембраны уравнивали в течение 6 нс по нижеприведенному протоколу (Таблица 1). Расчет молекулярной динамики проводили в программе AMBER<sup>5</sup>.

**Таблица 1: Протокол молекулярной динамики. Уравнивание модели мембраны.**

|   |   |
|---|---|
| Потенциальное поле  | Berger et al. UA                        |
| Длина траектории  | 6 нс (3000000 шагов)                    |
| Шаг интегрирования  | 2 фс                                    |
| Шаг записи в траекторный файл   | 5000                                    |
| Для численного интегрирования использовался алгоритм Leap-Frog.   |   |
| Термостат   | Динамика Ланжевена                      |
| Температура   | 300 K                                   |
| Частота столкновения виртуальных частиц с атомами в рассчитываемой системе термостате                         | $1 \text{ c}^{-1}$                      |
| Метод учета электростатических взаимодействий   | PME                                     |
| Радиус обрезания для кулоновского взаимодействия  | $12 \text{ \AA}$                        |
| Диэлектрическая проницаемость среды   | 1                                       |
| Использовалась кубическая периодическая ячейка размером   | $96 \times 90 \times 100 \text{ \AA}^3$ |
| Начальные скорости задавались в соответствии с распределением Максвелла с помощью генератора случайных чисел. |   |
| Расчет молекулярной динамики проводили при постоянном давлении с использованием анизотропного баростата.      |   |

Для встраивания структуры канала в мембраны использовали программу G\_MEMBED программного пакета GROMACS<sup>6</sup>. Алгоритм работы данной программы заключается в следующем: белок предварительно сжимается в два раза в XY-плоскости и затем в таком состоянии вставляется в фосфолипидную мембрану. Молекулы липида, пересекающиеся с группами белка, автоматически элиминируются. Калиевый канал KcsA не симметричен относительно плоскости мембраны. В связи с этим количество молекул липида, которое программа убирает из верхнего и нижнего листов мембраны, должно

<sup>4</sup> <http://moose.bio.ucalgary.ca/>

<sup>5</sup> <http://ambermd.org/>

<sup>6</sup> <http://www.gromacs.org/>

различаться. Площадь верхней части белка больше площади нижней части на 620 Å, это соответствует приблизительно 10 молекулам липида ДПФХ (число молекул липида уточняли дополнительно встраиванием белка в неуравновешенную мембрану с помощью программы ViLayer и дальнейшим расчетом количества липидов в верхнем и нижнем слоях). Далее рассчитывается молекулярная динамика системы. На каждом шаге белок увеличивается в размере в XY плоскости, а молекулы липидов раздвигаются. К концу расчета белок приобретает первоначальные размер и форму [50].

На следующем этапе проводили расчет молекулярной динамики при условии ограниченной подвижности белка и ионов. Белок и ионы калия внутри СФ фиксировали потенциалом Гука с константой жесткости 10 ккал/моль/Å<sup>2</sup>. Длительность расчета составляла 2 нс и была выбрана в соответствии с рекомендованными авторами программы G\_MEMBED параметрами для уравнивания мембраны после вставки белка. К концу расчета мембрана была отрелаксирована, а полость белка была заполнена молекулами воды. Число молекул воды в полости канала к концу расчета молекулярной динамики было равно 62.

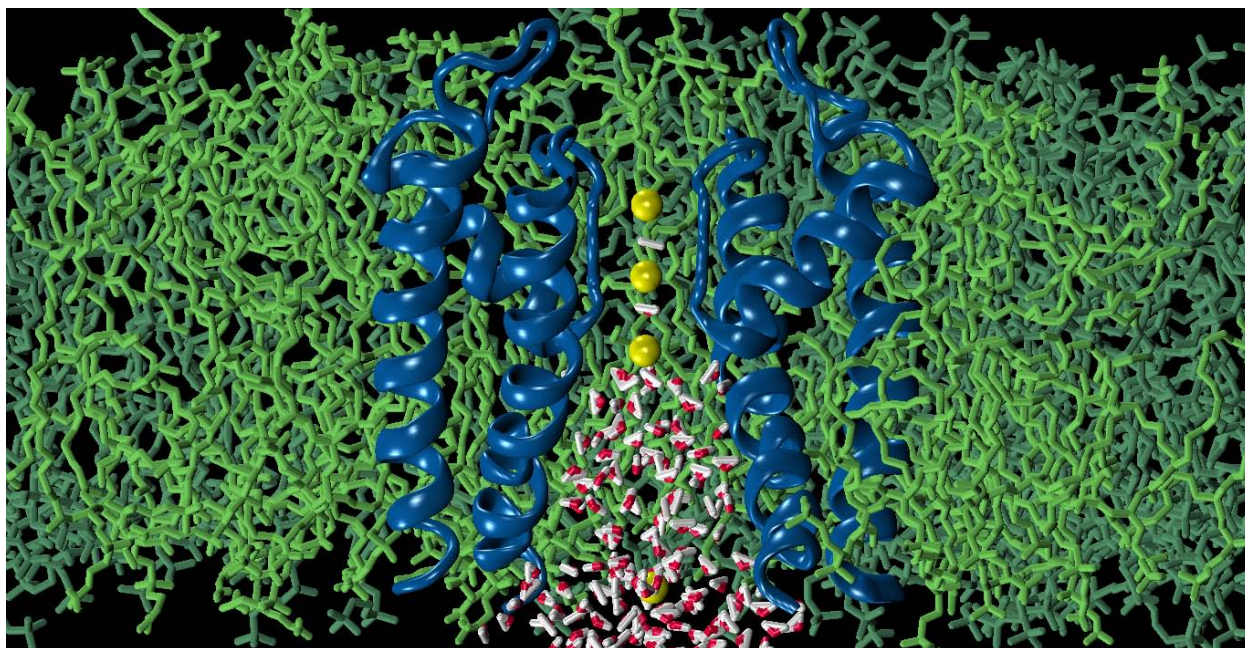
Ячейку с калиевым каналом, мембраной и водой заполняли дополнительными ионами калия и хлора до концентрации 150 мМ. Для этого использовали программу TLEAP программного пакета AMBER. TLEAP создает решетку с размером ячейки 1 Å. Данная решетка накладывается на систему, и далее в каждом узле рассчитывается значение электростатического потенциала. На основе рассчитанных значений программа расставляет в системе дополнительные ионы: в точку с малым значением потенциала ставится катион и наоборот. Положение ионов, случайно попавших в липидный бислой, было скорректировано вручную. В общей сложности было добавлено 40 ионов калия и 48 ионов хлора.

Группы белка освобождали, и снова запускали расчет молекулярной динамики на 6 нс. Изображение отреласированной системы приведено на рисунке 10. На основе полученной траектории строили график СКО структуры канала от первоначальной структуры. СКО структуры от первоначальной рассчитывается по следующей формуле:

$$CKO(r_1, r_2) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_{1i} - r_{2i})^2},$$

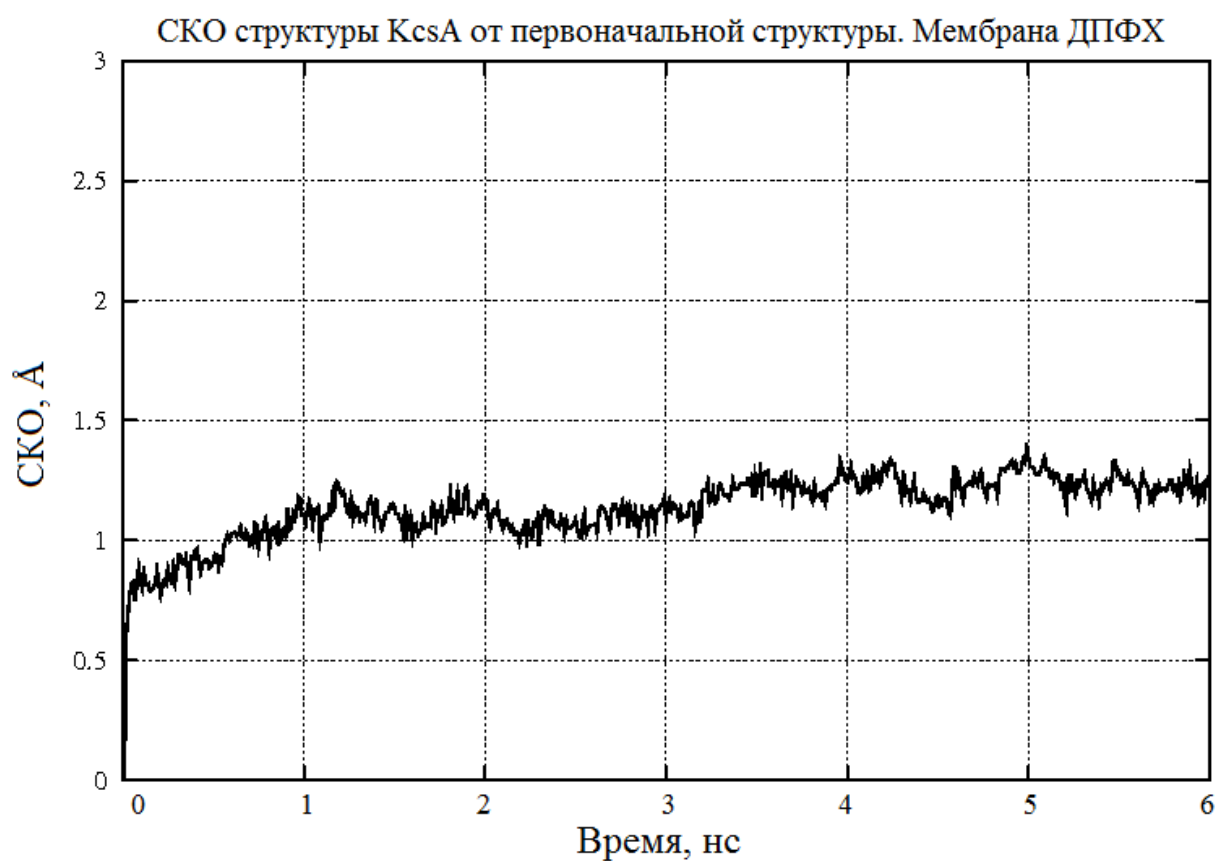
где  $r_{1i}$ ,  $r_{2i}$  – координаты  $i$ -ого атома начальной и текущей структур соответственно,  $N$  – общее число атомов в структуре.

Для расчета СКО использовали программу PTRAJ программного пакета AMBER. График СКО приведен на рисунке 11.



**Рисунок 10: Система калиевый канал KcsA в мембране ДПФХ.**

Калиевый канал изображен синим цветом, фосфолипиды – зеленым, ионы калия – желтым.



**Рисунок 11: График СКО структуры KcsA от первоначальной структуры.**

СКО структуры канала для системы с мембраной ДПФХ. Кривая выходит на плато после 4 нс расчета, максимальное значение СКО составляет 1.3 Å. См. пояснения в тексте.

Кривая СКО для расчетной системы выходят на плато после 4 нс. Максимальное значение СКО составляет 1.3 Å. Оно лежит в пределах среднего значения СКО для мембранных белков (2 Å), известного из литературы. После визуального анализа было отмечено, что вторичная структура внутренних спиралей канала утрачивается на С-терминальных участках. Такая нестабильность открытой структуры KcsA может быть обусловлена несколькими причинами. С одной стороны состав мембраны может оказывать влияние на стабильность структуры канала. Экспериментально известно, что если в мембране нет анион-липидов, то ионный ток через KcsA отсутствует [23]. Однако то, что анион-липиды влияют именно на состояние главных ворот показано не было. Ведь в канале есть два типа ворот, главные, обращенные в цитоплазму, и на уровне СФ. На какие именно ворота состав мембраны оказывает влияние пока неизвестно. С другой стороны отсутствие цитоплазматической части канала должно дестабилизировать структуру. Согласно данным, известным из литературы, структура канала без цитоплазматической части является менее термостабильной, чем целая структура [51]. В структуре, используемой для расчета, также отсутствуют остатки гистидина, которые должны участвовать в поддержании ее стабильности [15]. В дальнейших расчетах концы внутренних спиралей канала фиксировали потенциалом Гука с константой жесткости 4.0 ккал/моль/Å<sup>2</sup>. Также фиксировали торсионные углы аминокислотных остатков СФ. Это делалось по следующим причинам. Согласно данным, известным из литературы, при моделировании калиевых каналов часто наблюдается поворот карбонильного кислорода V76 на 180° [24, 36]. Это препятствует проведению ионов калия через СФ, т.к. данный атом кислорода образует сольватную оболочку для ионов. В настоящей работе также было получено, что при моделировании канала со свободным СФ наблюдается поворот данного атома кислорода против оси канала. Чтобы избежать этого в дальнейшем торсионные углы СФ фиксировали потенциалом Гука с константой жесткости 1.5 ккал/моль/рад<sup>2</sup> (среднее квадратичное отклонение значения торсионного угла равно 51°) [36].



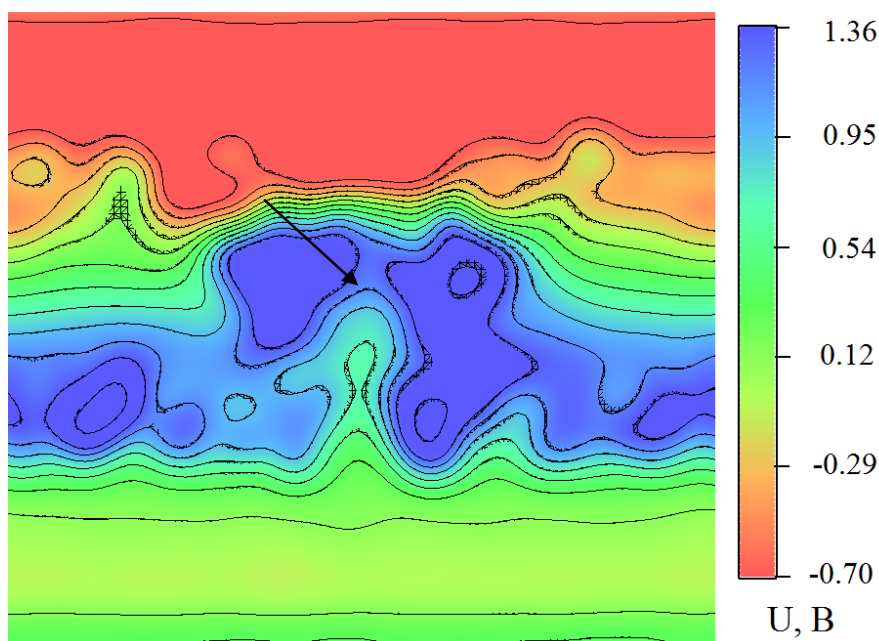
## Глава 3

# Моделирование процесса проведения ионов через KcsA

В разделе «Моделирование процесса проведения ионов через KcsA» приведены результаты расчета электростатического потенциала в системе с различной концентрацией ионов калия по разные стороны мембраны, результаты молекулярной динамики системы в условиях внешнего поля, результаты расчета свободной энергии для одного иона калия в канале и для триплета ионов в СФ.

### 3.1.1. Карта электростатического потенциала в системе в условиях разности зарядов по обе стороны фосфолипидной мембраны.

С помощью программы VMD для системы с различной концентрацией ионов калия по разные стороны мембраны была построена карта электростатического потенциала. Полученные данные приведены на рисунке 11.



**Рисунок 12: Карта электростатического потенциала системы.**

Слева приведена карта электростатического потенциала. Стрелочкой отмечена область СФ канала. Справа приведена шкала напряжений. См. пояснения в тексте.

Основное падение потенциала должно приходиться на слои, для которых диэлектрическая проницаемость минимальна. Например, в системе мембраны с

раствором, основное падение потенциала приходится на мембрану. В системе с калиевым каналом основное падение потенциала на оси канала приходится на СФ согласно литературным данным [37]. Для расчета карт электростатического потенциала были созданы две системы с различной и одинаковой концентрацией ионов калия по разные стороны мембраны. Чтобы растворы не перемешивались, в системы был введен слой вакуума. Слой вакуума не позволяет ионам свободно переходить из одного раствора в другой. Данный прием был описан ранее в литературе [38]. Карты потенциала были построены на основе траекторий молекулярной динамики длительностью 10 нс каждая. Полученные данные хорошо согласуются с информацией, известной из литературы: основное падение потенциала в системе с различной концентрацией ионов калия приходится на СФ KcsA. Это обусловлено тем, что в канале имеется полость, заполненная молекулами воды. Также на полученных картах видно, что значение потенциала в растворах (по разные стороны мембраны) одинаково в пределах каждого из них. В растворе с меньшим содержанием ионов калия рядом с мембраной наблюдается кратковременное увеличение потенциала. Это объясняется следующим фактом: рядом с мембраной существует слой иммобилизованных молекул воды. Они ориентируются во внешнем поле против него и создают кратковременное увеличение потенциала, наблюдаемое на рисунке.

### **3.1.2. Моделирование процесса проведения ионов калия через KcsA.**

#### **Вольтамперная характеристика калиевого канала. Два механизма проводимости. Изменение структуры СФ.**

Для моделирования процесса проведения ионов калия через KcsA под действием внешнего поля использовали программный пакет NAMD<sup>7</sup>. Внешнее поле в системе задается через значение напряженности по оси OZ в протоколе молекулярной динамики. Расчет проводили для двух систем с концентрацией соли калия 70 и 150 мМ и при семи значениях напряженности: 0.160, 0.225, 0.300, 0.375, 0.450 и 0.900 ккал/моль/Å/e. Данным значениям напряженности соответствует напряжение в 0, 83, 117, 156, 195, 234 и 313 мВ на СФ (пересчет напряженности внешнего поля в напряжение на СФ приведен в разделе «Приложение»).

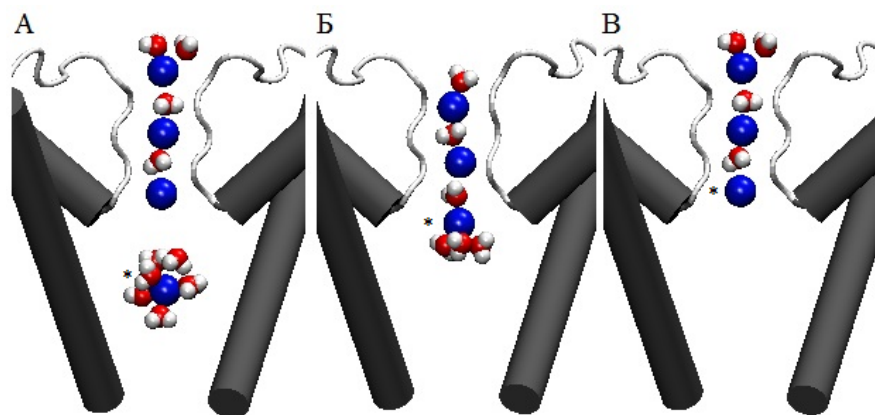
В процессе молекулярной динамики ионы калия проходили через пору канала из области высокого напряжения в область низкого напряжения. Процесс проведения иона

---

<sup>7</sup> <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>



калия выглядит следующим образом (Рисунок 11): гидратированный ион входит в полость канала и продвигается к СФ. На входе в СФ канала ион снимает гидратную оболочку за исключением двух молекул воды, расположенных сверху и снизу от него. Через СФ ионы проходят согласно принципу single file, т.е. одной колонной. Механизм проведения ионов соответствует knock-on механизму, описанному ранее в разделе «Обзор литературы»: ионы, находящиеся в СФ, двигаются по направлению к внешней среде под действием дополнительного иона, расположенного на входе в СФ и проталкивающего колонну дальше. На выходе из СФ канала ион снова одевает гидратную оболочку.

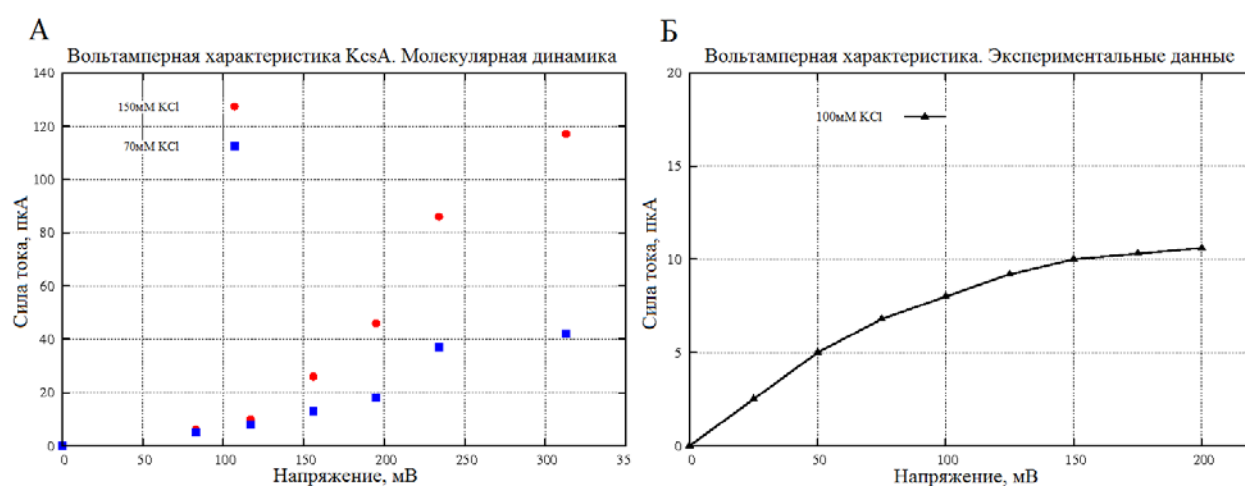


**Рисунок 13: Цикл проведения ионов калия через KcsA.**

А: Гидратированный ион входит в полость канала. СФ в состоянии  $S_4/S_2/S_0$ . Б: Ион продвигается к СФ и частично снимает гидратную оболочку. СФ в состоянии  $S_3/S_1$ . В: Ион входит в СФ. СФ в состоянии  $S_4/S_2/S_0$ . Цикл завершен.

На основе сделанных расчетов молекулярной динамики были построены кривые вольтамперной характеристики калиевого канала, которые приведены на рисунке 12. Там же приведены экспериментальные данные, полученные для единичного KcsA [52]. Из графиков можно заключить, что форма кривых, полученных теоретически и экспериментально, носит одинаковый характер. При низких значениях напряжения на кривых наблюдается линейный участок, при высоких значениях напряжения – выход на плато. Однако кривая, полученная с помощью молекулярной динамики, выходит на плато несколько позже. Это может быть обусловлено несколькими причинами. Во-первых, известным артефактом используемой для расчета модели воды – TIP3P. Очевидно, что для насыщающего значения напряжения на мембране скорость тока будет определяться концентрацией соли калия в растворе и значением диффузии в воде. Из литературных данных известно, что самодиффузия молекул воды для модели TIP3P больше экспериментального в 2.26 раза. Таким образом, поздний выход кривой на плато может быть обусловлен завышенным значением диффузии в воде. Во-вторых, на значения

вольтамперной характеристики важное влияние должна оказывать структура канала, используемая для измерения. Ранее было оговорено, что атомы внутренних спиралей и торсионные углы СФ канала ограничивали потенциалом Гука, чтобы удерживать канал в открытом неинактивированном состоянии. С другой стороны из литературы известно, что структура канала KcsA вполне динамична, и что канал может переходить между различными состояниями, характеризующимися разной скоростью проведения ионов калия. Вполне вероятно, что структура канала, используемая для молекулярно-динамического расчета и структура, для которой были получены экспериментальные данные, не совпадают. И, в-третьих, немаловажным является тот факт, что измерения тока по методу молекулярной динамики проводили на малых временах (100 нс для каждого значения напряженности), ограниченных возможностью компьютерных ресурсов.

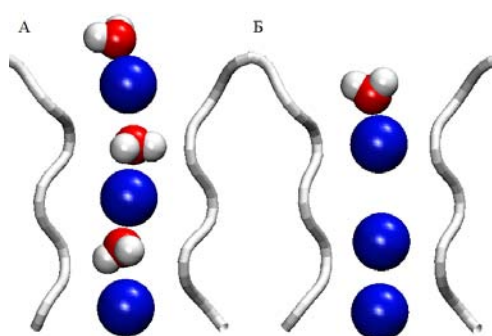


**Рисунок 14: Графики вольтамперной характеристики KcsA.**

А: Данные, полученные с помощью метода молекулярной динамики для системы с внешним полем. Расчеты проводили для двух систем с концентрацией соли калия 150 мМ (красные точки) и 70 мМ (синие точки). Б: Экспериментальные данные [52]. Данные получены для системы с концентрацией соли калия 100 мМ. См. пояснения в тексте.

На полученных кривых вольтамперной характеристики можно различить два участка, которым соответствуют разные скорости роста ионного тока от напряжения. Для этих двух участков были показаны два различных механизма проведения ионов калия через СФ канала. Первый механизм, показанный при высоких напряжениях, характеризуется следующим образом: скорость ионного тока относительно высокая, в каждый момент времени в СФ канала может находиться не более двух ионов калия, ионы разделены молекулами воды (Рисунок 13А). Второй механизм, показанный при низких напряжениях, характеризуется относительно низкой скоростью проведения ионов и тем, что в каждый момент времени в СФ канала может находиться более двух ионов калия (Рисунок 13Б). В последнем случае ионы не разделены молекулами воды. Подобное

поведение ионов калия в СФ было показано ранее для калиевого канала Kv1.2 [36, 37]. В данных работах было отмечено, что отношение числа ионов калия к числу молекул воды, проходящих через СФ не больше 1. Однако полного разделения на два различных механизма проведения показано не было. В разделе «Обзор литературы» было подробно рассказано о типах инактивации KcsA. Предположение о возможном механизме инактивации  $I_i$  или  $I_f$  было высказано в работе Chakrapani S. et al.: канал может блокироваться ионами калия, входящими из раствора. В настоящей работе было показано значительное уменьшение ионного тока через KcsA в том случае, когда ионы калия входят в СФ без молекул воды (второй механизм).



**Рисунок 15: Два механизма проведения ионов через СФ.**

А: Первый механизм проведения, характеризующийся высоким током, а также тем, что на уровне СФ может находиться не более двух ионов калия. Ионы разделены молекулами воды. Б: Второй механизм проведения, характеризующийся низким током, а также тем, что на уровне СФ может находиться более двух ионов калия. Ионы не разделены молекулами воды.

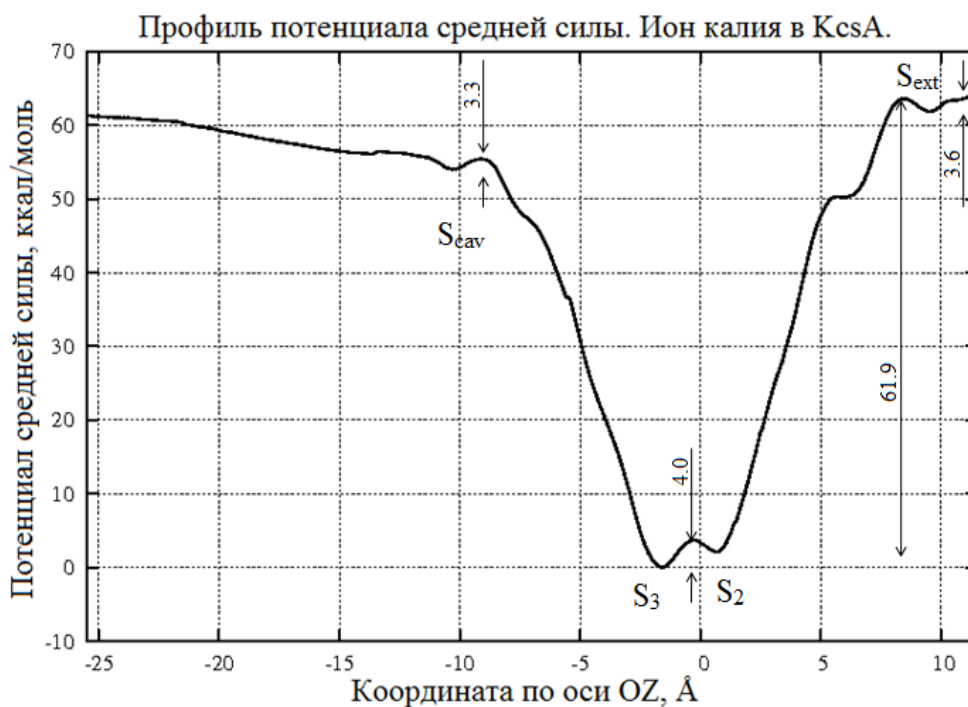
В начале молекулярной динамики структура СФ значительно изменялась. Следует сказать, что еще в процессе релаксации системы, которую проводили на начальном этапе работы, ион калия, находившийся в  $S_2$  сайте связывания, переходил в  $S_1$  сайт. В результате этого СФ канала изменил свою структуру и перешел в спавшееся состояние. Далее в процессе молекулярной динамики системы во внешнем поле СФ канала снова изменял структуру и возвращался в расправленное состояние. При этом ион калия также возвращался из  $S_1$  сайта в  $S_2$ . Было сделано предположение, что такое поведение СФ может быть обусловлено действием внешнего поля и/или действием потенциала Гука, приложенного к торсионным углам. Дополнительно были проведены расчеты динамики двух систем: в одной системе прикладывали внешнее поле, в другой – потенциал Гука к торсионным углам СФ. В обеих полученных траекториях молекулярной динамики наблюдали переход СФ из спавшегося состояния в расправленное.

### **3.1.3. Построение профилей свободной энергии по методу ABF для одного иона калия в канале и для триплета ионов в СФ.**

На завершающем этапе работы рассчитывали профиль свободной энергии для одного иона калия в канале и для триплета ионов на уровне СФ с помощью метода ABF, принцип

которого был описан ранее в разделе «Обзор литературы». Для расчета использовали две системы с одним и тремя ионами в канале соответственно. Полученные результаты представлены на рисунках 14 и 15.

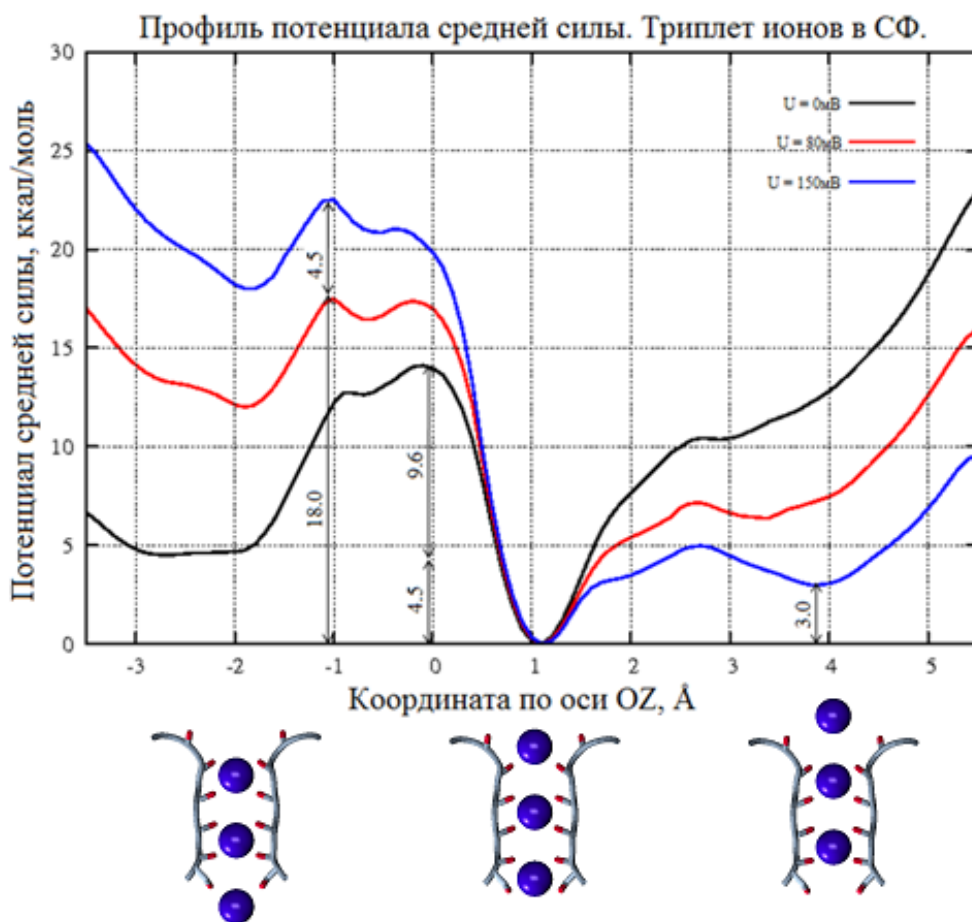
На профиле свободной энергии для одного иона калия в канале (Рисунок 14) показаны четыре сайта связывания, один из которых находится на уровне водной полости канала и соответствует  $S_{cav}$  сайту связывания, два – на уровне СФ, соответствуют  $S_3$  и  $S_2$  сайтам и один – во внешней среде, соответствуют  $S_{ext}$  сайту. Высота барьера для выхода из сайта связывания в водной полости составляет 3.3 ккал/моль, на уровне СФ – 4.0 ккал/моль для выхода из  $S_3$  сайта и 61.9 ккал/моль для выхода из  $S_2$  сайта, во внешней среде – 3.6 ккал/моль. Из полученного профиля свободной энергии можно сделать следующие выводы. Во-первых, в связи с высоким энергетическим барьером для выхода иона калия из СФ канала, можно заключить, что, однажды войдя в KcsA, ион калия остается в нем до изменения внешних условий (появления напряжения на мембране, дополнительных ионов в полости канала и т.д.), другими словами KcsA всегда заполнен ионами калия. Во-вторых, для эффективного проведения ионов через СФ канала необходимо, чтобы они двигались не по одному, а «пачками» по два и более иона.



**Рисунок 16: Профиль потенциала средней силы. Ион калия в KcsA.**

$S_{cav}$ ,  $S_3$ ,  $S_2$ ,  $S_{ext}$  – сайты связывания для иона калия в KcsA. Цифрами обозначены энергетические барьеры для продвижения иона калия вдоль поры калиевого канала.

Профиль свободной энергии для триплета ионов калия в СФ был построен для трех различных значений напряжения на мембране – +0 мВ, +80 мВ и +150 мВ. Полученные результаты приведены на рисунке 13.



**Рисунок 17: Профиль потенциала средней силы. Триплет ионов в СФ.**

Синяя кривая соответствует напряжению на СФ 150 мВ, красная – 80 мВ, черная соответствует системе без внешнего поля. Цифрами обозначены высоты энергетического барьера для входа иона в СФ. Ниже приведены изображения состояний СФ, соответствующих точкам на графике потенциала средней силы.

Для данного профиля свободной энергии были сделаны следующие наблюдения: величина энергетического барьера для входа иона калия в СФ уменьшается с возрастанием напряжения на мембране. Она равна 9.6, 5.9 и 4.5 ккал/моль при 0, 80 и 150 мВ соответственно. Также наблюдается увеличение глубины энергетической ямы для состояния  $S_3/S_1/S_{\text{ext}}$ . Данное состояние должно соответствовать глобальному минимуму на профиле свободной энергии для эффективного проведения триплета ионов через СФ из области высокого напряжения в область с низким напряжением. Однако этого показано не было в связи с тем, что в системе отсутствуют дополнительные ионы, которые должны входить в полость канала и оказывать заметное влияние на весь процесс проведения. В

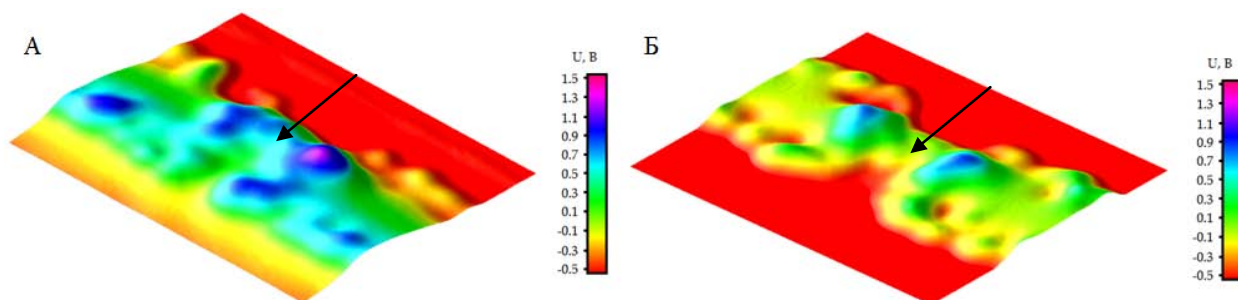
связи с этим авторами настоящей работы в дальнейшем планируется провести расчет профиля свободной энергии для системы с концентрацией ионов калия 150 мМ.

## Выводы:

В результате проделанной работы были сделаны следующие выводы:

- 1) Была построена модель системы открытый калиевый канал KcsA в мембране. Был смоделирован процесс проведения ионов калия через канал под действием внешнего электростатического поля. Были построены профили свободной энергии для единичного иона в канале и для триплета ионов в СФ.
- 2) Показано, что падение напряжения в системе с калиевым каналом приходится на СФ.
- 3) В зависимости от величины напряженности внешнего поля были показаны два различных механизма проведения ионов через СФ, отличающиеся величиной ионного тока.
- 4) Форма кривых вольтамперной характеристики, полученных теоретически и экспериментально, носит одинаковый характер: при малых напряжениях наблюдается линейная зависимость, при высоких напряжениях – насыщение и выход на плато.
- 5) С увеличением напряжения на мембране энергетический барьер для иона, входящего в СФ, уменьшается. Высота барьера для иона в отсутствии внешнего поля составляет 9 ккал/моль, при 150 мВ напряжения на мембране – 4 ккал/моль.
- 6) Было показано, что вероятность проведения единичного иона через СФ канала мала. Для эффективного проведения ионы должны передвигаться в комплексе.

# Приложение



**Рисунок 18: Карты электростатического потенциала системы.**

А: Система с разным количеством ионов калия по разные стороны мембраны. Б: Система с одинаковым количеством ионов калия по разные стороны мембраны. Справа от изображений приведены шкалы напряжений. Область СФ канала отмечена стрелочками.

**Таблица 2: Протокол молекулярной динамики. Система во внешнем электростатическом поле.**

|   |  |
|---|--|
| Потенциальное поле  | Amber03<br>Berger et al. UA  |
| Длина траектории  | 10 нс (5000000 шагов)  |
| Шаг интегрирования  | 2 фс   |
| Шаг записи в траекторный файл   | 5000   |
| Для численного интегрирования использовался алгоритм Leap-Frog.                       |  |
| Термостат   | Динамика Ланжевена   |
| Температура   | 300 К  |
| Частота столкновения виртуальных частиц с атомами в рассчитываемой системе термостате | $1 \text{ c}^{-1}$   |
| Метод учета электростатических взаимодействий   | PME  |
| Радиус обрезания для кулоновского взаимодействия                                      | $12 \text{ \AA}$   |
| Диэлектрическая проницаемость среды   | 1  |
| Использовалась кубическая периодическая ячейка размером                               | $96 \times 90 \times 100 \text{ \AA}^3$                                |
| Напряженность внешнего поля   | 0, 0.160, 0.225, 0.300, 0.375, 0.450 и 0.900 ккал/моль/ $\text{\AA}/e$ |

Начальные скорости задавались в соответствии с распределением Максвелла с помощью генератора случайных чисел.

Расчет молекулярной динамики проводили при постоянном давлении с использованием анизотропного баростата.

## Пересчет напряженности внешнего поля в напряжение на СФ:

Для моделирования проведения ионов калия были выбраны следующие значения напряженности внешнего поля: 0.160, 0.225, 0.300, 0.375, 0.450 и 0.900 ккал/моль/ $\text{\AA}/e$ . Пересчет напряженности внешнего поля в напряжение проводили согласно формуле для плоского конденсатора:



$$U = E \cdot d,$$

где  $U$  – напряжение между обкладками конденсатора,  $E$  – напряженность,  $d$  – расстояние между пластинами конденсатора. Ранее было показано, что в системе с калиевым каналом основное падение потенциала на оси канала приходится на СФ. Следовательно, в качестве величины  $d$  нужно брать длину СФ канала, которая составляет 12 Å. Далее приведена таблица значений напряженности внешнего поля и соответствующие им значения напряжения на СФ (Таблица 2).

**Таблица 3: Пересчет напряженности внешнего поля в напряжение на СФ.**

| Напряженность внешнего поля, ккал/моль/Å/e | Напряжение на СФ, мВ |
|--|----------------------|
| 0.160                                      | 0, 83                |
| 0.225                                      | 117                  |
| 0.300                                      | 156                  |
| 0.375                                      | 195                  |
| 0.450                                      | 234                  |
| 0.900                                      | 313                  |

**Таблица 4: Протокол молекулярной динамики. Расчет профиля потенциала средней силы.**

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| Потенциальное поле  | Amber03<br>Berger et al. UA |
| Длина траектории  | 6 нс (3000000 шагов)        |
| Шаг интегрирования  | 2 фс                        |
| Шаг записи в траекторный файл   | 5000                        |
| Для численного интегрирования использовался алгоритм Leap-Frog.   |                             |
| Термостат   | Динамика Ланжевена          |
| Температура   | 300 К                       |
| Частота столкновения виртуальных частиц с атомами в рассчитываемой системе термостате                         | 1 c <sup>-1</sup>           |
| Метод учета электростатических взаимодействий   | PME                         |
| Радиус обрезания для кулоновского взаимодействия  | 12 Å                        |
| Диэлектрическая проницаемость среды   | 1                           |
| Использовалась кубическая периодическая ячейка размером   | 96×90×100 Å <sup>3</sup>    |
| Начальные скорости задавались в соответствии с распределением Максвелла с помощью генератора случайных чисел. |                             |
| Расчет молекулярной динамики проводили при постоянном давлении с использованием анизотропного баростата.      |                             |

## Список литературы:

1. Shin-Ho Chung, O., *Biological Membrane Ion Channels: Dynamics, Structure, and Applications*, ed. Springer. 2006. 1-658.
2. Fermini, B., *Recent Advances in Ion Channel Screening Technologies*, in *Ion Channels*. 2008. p. 1-25.
3. MacKinnon, R., *Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction (Nobel Lecture)*. Angewandte Chemie (International ed. in English), 2004. **43**(33): p. 4265-4277.
4. Boiteux, C.I., et al., *Ion conductance vs. pore gating and selectivity in KcsA channel: Modeling achievements and perspectives*. Journal of Molecular Modeling, 2007. **13**(6): p. 699-713.
5. Zhou, Y., et al., *Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 43-48.
6. Miloshevsky, G. and P. Jordan, *Conformational Changes in the Selectivity Filter of the Open-State KcsA Channel: An Energy Minimization Study*. 2008. **95**(7): p. 3239-3251.
7. Shrivastava, I. and M. Sansom, *Molecular dynamics simulations and KcsA channel gating*. European biophysics journal : EBJ, 2002. **31**(3): p. 207-216.
8. Liu, Y.-S., P. Somporpisut, and E. Perozo, *Structure of the KcsA channel intracellular gate in the open state*. Nature Structural & Molecular Biology, 2001. **8**(10): p. 883-887.
9. M., F., and C., *Targeted molecular dynamics of an open-state KcsA channel*. J. Chem. Phys., 2005. **122**(13).
10. Chung, S.-H., T. Allen, and S. Kuyucak, *Conducting-state properties of the KcsA potassium channel from molecular and Brownian dynamics simulations*. Biophysical Journal, 2002. **82**(2): p. 628-645.
11. Biggin, P. and M. Sansom, *Open-state models of a potassium channel*. Biophysical Journal, 2002. **83**(4): p. 1867-1876.
12. Финкельштейн, *Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами*. 2005: М: КДУ. 1-456.
13. Holyoake, J., et al., *KcsA closed and open: modelling and simulation studies*. European Biophysics Journal, 2004. **33**(3): p. 238-246.

14. Cuello, L., et al., *Structural mechanism of C-type inactivation in K<sup>+</sup> channels*. Nature, 2010. **466**(7303): p. 203-208.
15. Thompson, A., et al., *Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(19): p. 6900-6905.
16. Negoda, A., M. Xian, and R. Reusch, *Insight into the selectivity and gating functions of Streptomyces lividans KcsA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(11): p. 4342-4346.
17. Gao, L., et al., *Activation-coupled inactivation in the bacterial potassium channel KcsA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(49): p. 17630-17635.
18. Ogielska, E.M., et al., *Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K channels*. Biophysical Journal, 1995. **69**(6): p. 2449-2457.
19. Chakrapani, S., J. Cordero-Morales, and E. Perozo, *A Quantitative Description of KcsA Gating I: Macroscopic Currents*. The Journal of General Physiology, 2007. **130**(5): p. 465-478.
20. Chakrapani, S., J. Cordero-Morales, and E. Perozo, *A quantitative description of KcsA gating II: single-channel currents*. The Journal of General Physiology, 2007. **130**(5): p. 479-496.
21. Cordero-Morales, J., L. Cuello, and E. Perozo, *Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter*. Nature Structural & Molecular Biology, 2006. **13**(4): p. 319-322.
22. Bucher, D., L. Guidoni, and U. Rothlisberger, *The protonation state of the Glu-71/Asp-80 residues in the KcsA potassium channel: a first-principles QM/MM molecular dynamics study*. Biophysical Journal, 2007. **93**(7): p. 2315-2324.
23. Marius, P., et al., *Binding of Anionic Lipids to at Least Three Nonannular Sites on the Potassium Channel KcsA is Required for Channel Opening*. 2008. **94**(5): p. 1689-1698.
24. Kóna, J., et al., *A gate mechanism indicated in the selectivity filter of the potassium channel KcsA*. Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta), 2007. **117**(5): p. 1121-1129.
25. Cuello, L., et al., *Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K<sup>+</sup> channels*. Nature, 2010. **466**(7303): p. 272-275.
26. Cuello, L., et al., *pH-Dependent Gating in the Streptomyces lividans K<sup>+</sup> Channel*. Biochemistry, 1998. **37**(10): p. 3229-3236.
27. Meuser, D., et al., *Exploring the open pore of the potassium channel from Streptomyces lividans*. FEBS Letters, 1999. **462**(3): p. 447-452.

28. Heginbotham, L., et al., *Single streptomyces lividans K(+) channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation*. The Journal of General Physiology, 1999. **114**(4): p. 551-560.
29. Berneche, S. and B. Roux, *Energetics of ion conduction through the K<sup>+</sup> channel*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 73-77.
30. Jensen, F., *Introduction to Computational Chemistry*. 2001: JOHN WILEY & SONS. 1-429.
31. Leach, A.R., *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2001: Pearson Education. 1-773.
32. Young, D.A., *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real World Problems*. 2001: WILEY-INTERSCIENCE. 1-398.
33. Hénin, J.r., et al., *Exploring Multidimensional Free Energy Landscapes Using Time-Dependent Biases on Collective Variables*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2010. **6**(1): p. 35-47.
34. Darve, E., D. Gómez, and A. Pohorille, *Adaptive biasing force method for scalar and vector free energy calculations*. The Journal of chemical physics, 2008. **128**(14): p. 144120.
35. Zhong, Q., et al., *Molecular dynamics simulation of a synthetic ion channel*. Biophysical Journal, 1998. **74**(1): p. 3-10.
36. Khalili-Araghi, F., E. Tajkhorshid, and K. Schulten, *Dynamics of K<sup>+</sup> ion conduction through Kv1.2*. Biophysical Journal, 2006. **91**(6).
37. Jensen, M., et al., *Principles of conduction and hydrophobic gating in K<sup>+</sup> channels*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(13): p. 5833-5838.
38. Delemotte, L., et al., *Modeling membranes under a transmembrane potential*. The journal of physical chemistry. B, 2008. **112**(18): p. 5547-5550.
39. Compain, M., C. Ramseyer, and P. Huetz, *Ab initio investigation of the atomic charges in the KcsA channel selectivity filter*. Chemical Physics Letters, 2004. **397**(4-6): p. 510-515.
40. Bucher, D., et al., *Developing Improved Charge Sets for the Modeling of the KcsA K<sup>+</sup> Channel Using QM/MM Electrostatic Potentials*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2009. **5**(8): p. 2173-2179.
41. Bliznyuk, A. and A. Rendell, *Electronic Effects in Biomolecular Simulations: Investigation of the KcsA Potassium Ion Channel*. The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(36): p. 13866-13873.

42. Treptow, W. and M. Tarek, *Molecular Restraints in the Permeation Pathway of Ion Channels*. Biophysical Journal, 2006. **91**(3): p. L26-L28.
43. Boiteux, C., et al., *Ion conductance vs. pore gating and selectivity in KcsA channel: Modeling achievements and perspectives*. Journal of Molecular Modeling, 2007. **13**(6): p. 699-713.
44. Bucher, D., et al., *Polarization effects and charge transfer in the KcsA potassium channel*. Biophysical Chemistry, 2006. **124**(3): p. 292-301.
45. Guidoni, L. and P. Carloni, *Potassium permeation through the KcsA channel: a density functional study*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Biomembranes, 2002: p. 1-6.
46. Guidoni, L., *Water and potassium dynamics inside the KcsA K<sup>+</sup> channel*. FEBS Letters, 2000. **477**(1-2): p. 37-42.
47. Berger, O., O. Edholm, and F. Jähnig, *Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature*. Biophysical Journal, 1997. **72**(5): p. 2002-2013.
48. Ryckaert, J., *Molecular dynamics of liquid n-butane near its boiling point*. Chemical Physics Letters, 1975. **30**(1): p. 123-125.
49. Ryckaert, J.-P. and A. Bellemans, *Molecular dynamics of liquid alkanes*. Faraday Discuss. Chem. Soc., 1978. **66**: p. 95-106.
50. Wolf, M.G., et al., *g\_membed: Efficient insertion of a membrane protein into an equilibrated lipid bilayer with minimal perturbation*. J. Comput. Chem., 2010. **31**(11): p. 2169-2174.
51. Uysal, S., et al., *Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(16): p. 6644-6649.
52. LeMasurier, M., L. Heginbotham, and C. Miller, *KcsA: it's a potassium channel*. The Journal of General Physiology, 2001. **118**(3): p. 303-314.