

БИОИНФОРМАТИКА

УДК 577.152.3.

©Коллектив авторов

ПОЛНОАТОМНАЯ КОМПЬЮТЕРНАЯ МОДЕЛЬ БИСЛОЙНОЙ МЕМБРАНЫ С МАО А

Ю.Ю. Смолинская, А.В. Веселовский, А.С. Иванов

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва,
Погодинская ул., д.10, факс: (095)2450857; эл.почта: ivanov@ibmh.msk.su

В работе выполнено компьютерное моделирование фрагмента бислойной мембраны из дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ). Модель ДПФХ сконструирована на основе кристаллических структур холина и глицерофосфата с последующим достраиванием двух жирнокислотных остатков. Молекула ДПФХ была размножена и из полученных копий построена модель бислоя, содержащая 338 липидных молекул. Моделирование молекулярной динамики в водном окружении в течение 3,5 нс выполняли с оптимизированной структурой бислоя. Равновесие системы было достигнуто после 1,3 нс молекулярной динамики. Сопоставление ряда структурных параметров, рассчитанных из модели бислоя, с экспериментальными значениями показало их хорошее соответствие. С целью проверки возможности использования построенной модели бислоя для моделирования топологии мембранных белков в нее был встроен мембранный белок моноаминоксидаза А (МАО А), трехмерная структура и мембранная топология которого известны. Система, состоящая из липидного бислоя, белка и воды, оптимизирована с применением молекулярной динамики в течение 3,0 нс. Равновесная пространственная структура МАО А и её положение в мембране хорошо согласуются с кристаллической структурой этого фермента.

Ключевые слова: липидный бислой, молекулярная динамика, компьютерное моделирование, дипальмитоилфосфатидилхолин, моноаминоксидаза А, мембранный белок

ВВЕДЕНИЕ. Изучение строения участков белков, взаимодействующих с липидным бислоем, является актуальной задачей молекулярной структурной биологии. В связи с большими размерами мембранных белков, трудностями их биохимического выделения и кристаллизации, до настоящего времени расшифровано мало пространственных структур мембраносвязанных белков. На момент написания статьи в белковом банке данных PDB [1] содержится 82 таких структуры. Поэтому компьютерное моделирование является одним из методов, позволяющих исследовать структуру и мембранную топологию таких белков. В последние годы данному вопросу было посвящено довольно много работ [см. например 2-4], однако, до сих пор одной из проблем является создание адекватной модели липидного бислоя, хорошо отражающей свойства биологической мембраны. Такая модель должна быть достаточно устойчивой при длительном моделировании методами молекулярной динамики (МД) и правильно отражать

МОДЕЛЬ БИСЛОЙНОЙ МЕМБРАНЫ С МАО А

взаимодействия с водным окружением и белком. Существует несколько моделей, описывающих мембранное окружение для моделирования: а) модель сольватации, имитирующая липидный бислои (молекулы липидов и воды не задаются явно, их влияние учитывается путем модификации функции потенциальной энергии белка в вакууме), б) крупнозернистая модель бислоя (группировки атомов задаются сферами), в) полноатомная модель бислоя (все атомы задаются явно). Однако, именно полноатомная модель наиболее адекватно отражает свойства бислоя, а также взаимодействия с белком.

Целью данной работы было конструирование и последующая оптимизация фрагмента бислойной мембраны в водном окружении с последующим сравнением полученной модели с известными экспериментальными данными.

С целью подтверждения пригодности полученной модели для моделирования структуры и топологии мембранных белков в нее был встроен интегральный мембранный фрагмент белка моноаминоксидазы А (МАО А) (α -спираль) и выполнено моделирование МД. Затем к оптимизированному в мембране фрагменту белка была присоединена глобулярная часть МАО А, расположенная в водной фазе. Моделирование МД полученной системы с полноразмерным белком показало устойчивость последней, а также соответствие топологии и фолда МАО А известным экспериментальным данным [5].

МЕТОДИКА. Конструирование липидного бислоя выполнено с помощью программного комплекса Sybyl 6.9 фирмы Tripos [6] на сервере SGI Origin200. Оптимизация и моделирование МД бислоя были выполнены при помощи программы Gromacs 3.2 [7] на кластере из 16 2-х процессорных узлов на базе AMD MP 2200+ МГц, соединенных сетью Fast Ethernet под ОС Red Hat Linux 7.3.

Расчет парциальных зарядов липидов проводили полуэмпирическим квантовомеханическим методом AM1 [6]. Для оптимизации структуры и моделирования МД были использованы параметры силовых полей GROMOS и Lipid [8], а также модель SPC [9] для воды. Моделирование МД было выполнено при периодических граничных условиях, постоянном давлении (1 бар) [9] и температуре (323°K) [10, 11]. Для уменьшения объема расчетов при оценке дальнедействующих невалентных взаимодействий применяли функцию двухдиапазонной "отсечки" [8, 12] с параметрами 1,0 нм/1,8 нм. Взаимодействия на расстоянии 1,0 нм рассчитывались на каждом шаге моделирования МД, а на расстоянии 1,0-1,8 нм - через каждые 10 шагов.

Модель структуры дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) была построена по известным структурам холина и глицерофосфата (коды ACCNOB11 и DANJAX соответственно) из Кембриджской базы данных CSD [13], а также остатков пальмитиновой кислоты (рис. 1). Далее молекула ДПФХ была размножена и из полученных копий построена первичная модель бислоя. Каждый монослой состоял из 169 молекул ДПФХ.

Липидный бислои помещали в прямоугольную ячейку, так что плоскость XY ячейки располагалась вдоль мембраны, ось Z - перпендикулярно мембране. Первоначальный объем ячейки определяли как объем, занимаемый одной молекулой ДПФХ, + 8% для возможности свободной динамики липида при оптимизации, умноженный на количество молекул липида. Таким образом, сконструированная ячейка имела следующие линейные размеры: $X \times Y \times Z$ ($L_x \times L_y \times L_z$) - 9,2×9,2×5,2 нм соответственно. Ячейку заполняли молекулами воды, положение которых было заранее уравновешено друг относительно друга. С каждой стороны бислоя было добавлено около 15000 молекул воды, что увеличило высоту ячейки (L_z) до 15,6 нм. Такой размер ячейки был выбран для возможности использования модели при последующем моделировании взаимодействий мембраны с белком. Минимальное расстояние от молекулы воды до молекулы липида было выбрано 0,18 нм. Все молекулы воды, попавшие в область гидрофобных жирнокислотных остатков, были удалены, таким образом, общее количество воды составило 30715 молекул.

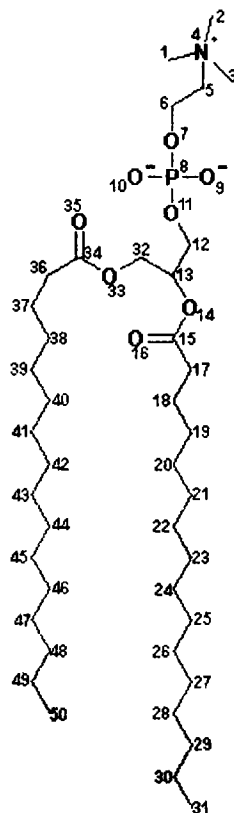


Рисунок 1.

Химическая структура ДПФХ. Нумерация атомов соответствует используемой в моделировании МД.

Для подтверждения пригодности модели бислоя в качестве среды моделирования структуры и топологии мембранных белков в работе была использована пространственная структура моноаминоксидазы А (МАО А) (код PDB 1O5W) [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Полярная головка молекулы ДПФХ состоит из глицерофосфата и холина. В связи с тем, что азот холина несет положительный заряд, а атомы кислорода фосфатной группы глицерофосфата - отрицательный, головка ДПФХ является диполем. Однако, в ряде работ [14, 15] по моделированию МД бислоя не было учтено реальное распределение зарядов: в холине положительный заряд с азота перераспределен на находящиеся рядом атомы углерода, в глицерофосфатной части отрицательный заряд с кислорода перенесен на фосфор (табл. 1). Таким образом, головка ДПФХ, оставаясь диполем, имеет распределение зарядов, которое не соответствует реальному химическому. Тем не менее, при формально неправильных парциальных зарядах липидный бислой сохранял стабильность при моделировании МД в течение коротких интервалов времени (120 пс) [14]. При моделировании МД нами были использованы парциальные заряды, рассчитанные полуэмпирическим квантовомеханическим методом AM1 [6]. Величины парциальных зарядов представлены в таблице 1.

В первые 30 пс моделирования МД бислоя при использовании таких величин парциальных зарядов наблюдается ряд переходных процессов, визуально выражающихся в значительных (65 нм) расхождениях листов бислоя. Однако в следующие 20 пс происходит восстановление и стабилизация системы: листки сходятся и бислой принимает нормальный вид. Эти временные расхождения листов бислоя, по-видимому, связаны с большим количеством стерических

МОДЕЛЬ БИСЛОЙНОЙ МЕМБРАНЫ С МАО А

Таблица 1. Распределение парциальных зарядов в молекуле ДПФХ, использованное в [14] и рассчитанное методом AM1 [6].

| Атом | Парциальные заряды (е), взяты из [14] | Парциальные заряды (е), рассчитанные с помощью AM1 [6] | Атом | Парциальные заряды (е), взяты из [14] | Парциальные заряды (е), рассчитанные с помощью AM1 [6] |
|------|--|--|------|--|--|
| C1 | 0,40 | 0,000 | C26 | 0,00 | 0,000 |
| C2 | 0,40 | -0,007 | C27 | 0,00 | 0,000 |
| C3 | 0,40 | 0,000 | C28 | 0,00 | 0,000 |
| N4 | -0,60 | 0,925 | C29 | 0,00 | 0,000 |
| C5 | 0,40 | 0,041 | C30 | 0,00 | 0,016 |
| C6 | 0,10 | 0,041 | C31 | 0,00 | -0,016 |
| O7 | -0,55 | -0,256 | C32 | 0,10 | 0,242 |
| P8 | 1,50 | 0,999 | O33 | -0,52 | -0,162 |
| O9 | -0,80 | -0,743 | C34 | 0,10 | 0,437 |
| O10 | -0,80 | -0,744 | O35 | -0,52 | -0,553 |
| O11 | -0,55 | -0,256 | C36 | 0,00 | 0,036 |
| C12 | 0,10 | 0,000 | C37 | 0,00 | 0,000 |
| C13 | 0,13 | 0,237 | C38 | 0,00 | 0,000 |
| O14 | -0,34 | -0,161 | C39 | 0,00 | 0,000 |
| C15 | 0,13 | 0,439 | C40 | 0,00 | 0,000 |
| O16 | -0,34 | -0,551 | C41 | 0,00 | 0,000 |
| C17 | 0,10 | 0,036 | C42 | 0,00 | 0,000 |
| C18 | 0,00 | 0,000 | C43 | 0,00 | 0,000 |
| C19 | 0,00 | 0,000 | C44 | 0,00 | 0,000 |
| C20 | 0,00 | 0,000 | C45 | 0,00 | 0,000 |
| C21 | 0,00 | 0,000 | C46 | 0,00 | 0,000 |
| C22 | 0,00 | 0,000 | C47 | 0,00 | 0,000 |
| C23 | 0,00 | 0,000 | C48 | 0,00 | 0,000 |
| C24 | 0,00 | 0,000 | C49 | 0,00 | 0,016 |
| C25 | 0,00 | 0,000 | C50 | 0,00 | -0,016 |

Примечание: Полужирным шрифтом отмечены наиболее значимые различия.

конфликтов в первоначальной сконструированной вручную структуре бислоя. Такое расхождение листов бислоя в процессе уравнивания бислоя было отмечено ранее [14]. Моделирование длительной МД в течение 3,5 нс с использованием такого распределения зарядов на молекуле ДПФХ показало высокую стабильность мембраны.

Структура бислоя после 3,5 нс моделирования МД представлена на рисунке 2. Цепи жирных кислот находятся в жидком состоянии, головки липидных молекул свободно распределяются и молекулы воды глубоко входят в область полярных головок [16]. На рисунке 3 показано изменение в ходе моделирования МД объема V (липида), площади S (липида), занимаемой одной молекулой ДПФХ, а также изменение толщины бислоя L_z (вдоль оси z). Равновесие системы было достигнуто после 1,3 нс моделирования МД. Для анализа свойств бислоя были использованы данные на участке равновесной траектории 2,5-3,5 нс. Средние значения макроскопических параметров бислоя приведены в таблице 2. Полученные величины хорошо согласуются с экспериментальными значениями (в пределах 3%) [17, 18]. Профили распределения плотности атомов и групп атомов в ячейке вдоль нормали Z к мембране показаны на рисунке 4. Фосфатные и холиновые группы распределены в границах приблизительно 1 нм. Уменьшение плотности в середине бислоя (примерно в два раза) согласуется с экспериментальными данными [19]. Вода заходит в область полярных головок липидов, в результате чего гидрофобная область, не содержащая молекул воды, составляет примерно 2,0-2,5 нм, что также согласуется с известными экспериментальными данными [20].

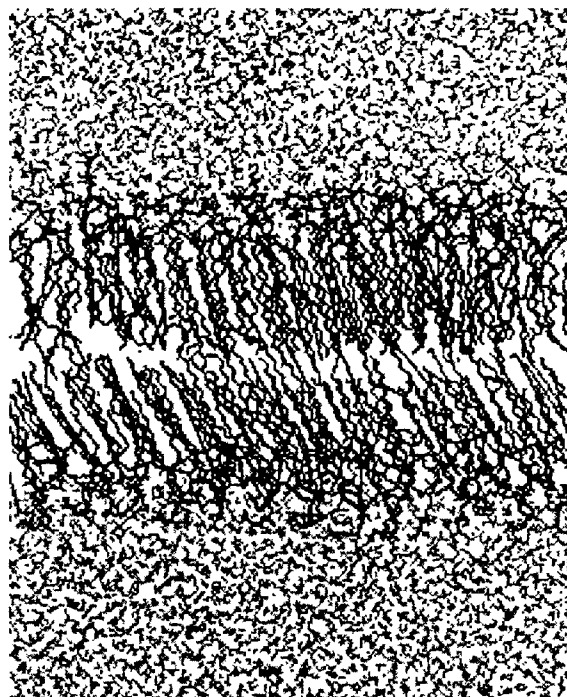


Рисунок 2.

Структура бислоя из ДПФХ после 3,5 нс моделирования МД. Молекулы воды показаны серым цветом, бислоем из ДПФХ - черным.

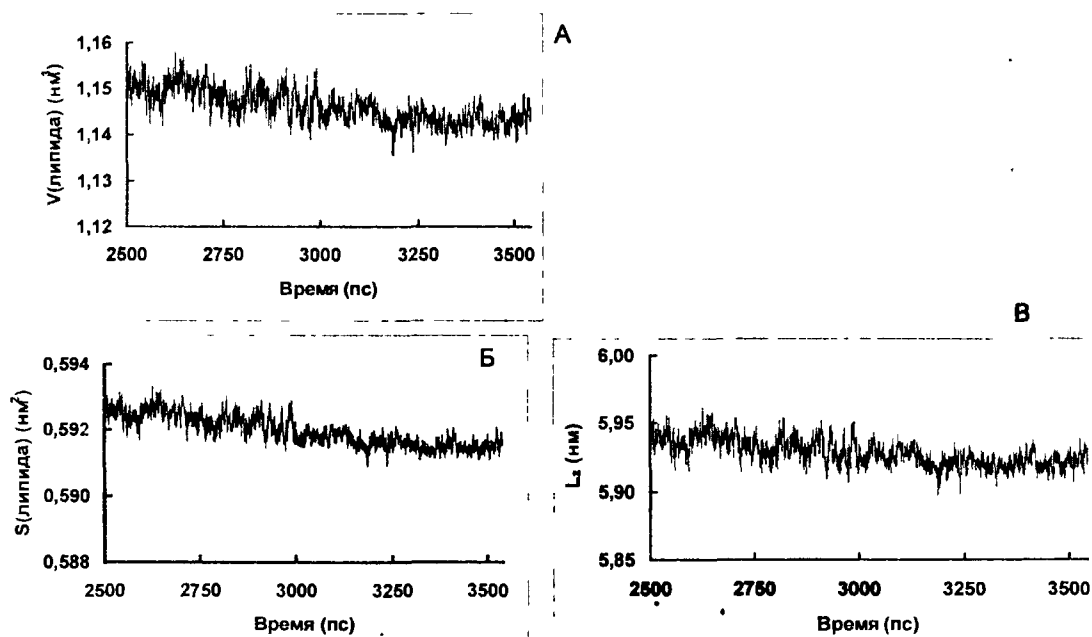


Рисунок 3.

Макроскопические параметры бислоя из ДПФХ на участке моделирования МД 2,5-3,5 нс. Изменение в ходе моделирования МД объема, занимаемого одной молекулой липида, V (липида) (А), площади, занимаемой одной молекулой липида, S (липида) (Б) и изменение толщины бислоя вдоль плоскости z , L_z (В).

МОДЕЛЬ БИСЛОЙНОЙ МЕМБРАНЫ С МАО А

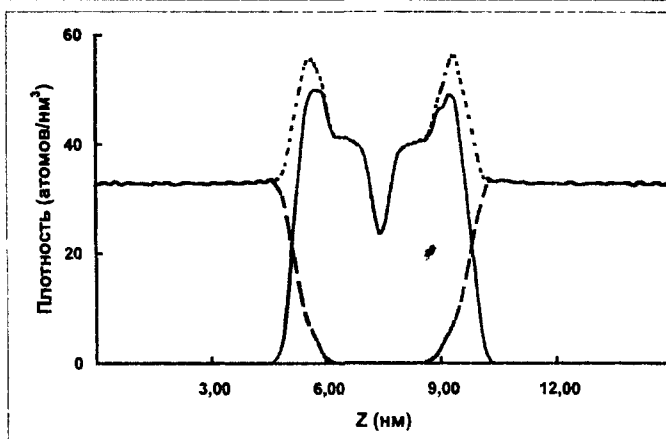


Рисунок 4.

Профили плотности различных групп атомов бислоя из ДПФХ.

Z - нормаль к поверхности бислоя. бислой из ДПФХ, вода, система ДПФХ/вода.

Нами был оценен параметр порядка (S_{CD}) - среднее положение каждого участка жирнокислотного остатка, рассчитанное для каждого атома ацильной цепи [21]. Изменение S_{CD} вдоль жирнокислотных остатков липидов представлено на рисунке 5. Кривая изменения S_{CD} , рассчитанная для системы после 3,5 нс моделирования МД, имеет типичный вид [22, 23]: плато в центральной области цепей и снижение S_{CD} в концевой части. В середине мембраны $S_{CD} = 0$, что свидетельствует о большой подвижности концевых групп. Значение S_{CD} , усредненное для участка C19-C23, совпадает с экспериментальным значением (0,21) [24]. Известно, что параметр порядка цепей уменьшается с увеличением площади, занимаемой одной молекулой липида [17] и равен 0,21 при площади 0,61 нм² [24].

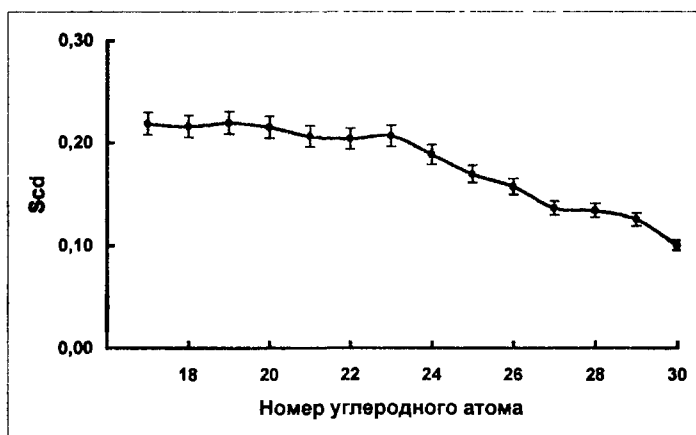


Рисунок 5.

Параметр порядка (SCD) вдоль жирнокислотных остатков липидов.

Построенная модель липидного бислоя была использована для моделирования топологии мембраносвязанного белка МАО А. Этот фермент играет центральную роль в метаболизме важнейших нейромедиаторов-моноаминов, а изменение активности этого фермента при многих нервнопсихических расстройствах и возможность их коррекции ингибиторами МАО сделали этот фермент популярным объектом фундаментальных и клинических исследований [25]. Белок МАО А состоит из двух частей [5]: водорастворимая глобулярная (фрагмент с 10 по 487 аминокислотный остаток) и мембранная гидрофобная (фрагмент с 488 по 520 аминокислотный остаток),

остатки с 1 по 9 в пространственной структуре МАО А отсутствуют. Мембраносвязанный участок МАО А состоит из короткого неупорядоченного фрагмента (остатки 488-497) и α -спирали (остатки 498-520). Моделирование МД в системе вода/белок/бислой было выполнено в 2 этапа. На первом этапе мембраносвязанный участок МАО А был встроен в равновесную модель бислоя. Моделирование МД этой системы выполнялось в течение 2,0 нс. Стабильное состояние было достигнуто спустя 500 пс. Анализ структуры мембраносвязанного участка МАО А после моделирования МД показал, что есть незначительные изменения в топологии неупорядоченного участка, в то время как структура α -спирали не изменилась. Структурное выравнивание $S\alpha$ -цепи этого участка и соответствующего участка из кристаллической структуры МАО А показало хорошее соответствие ($RMS = 0,12$ нм).

Вторым этапом было присоединение МАО А к оптимизированному мембраносвязанному участку глобулярной части белка. Моделирование МД полноразмерного белка МАО А в бислое было выполнено в течение 2,0 нс. Система вода/бислой/белок была уравновешена спустя 400 пс. Пространственное совмещение $S\alpha$ -цепей полноразмерного белка МАО А после моделирования МД и кристаллической структуры показало $RMS = 0,28$ нм (рис. 6).

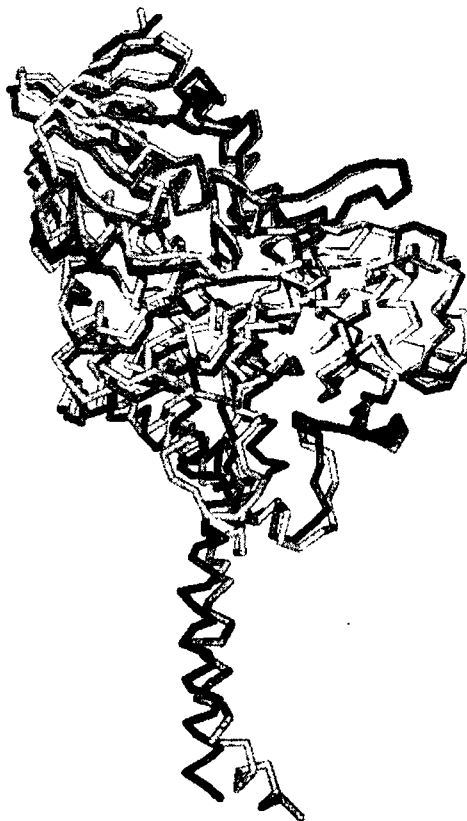


Рисунок 6.

Пространственное совмещение $S\alpha$ -цепей кристаллической структуры полноразмерного белка МАО А и модели после моделирования МД в течение 4,0 нс. Светлым показана $S\alpha$ -цепь МАО А после моделирования МД, темным - $S\alpha$ -цепь МАО А из кристаллической структуры.

Для оценки роли бислоя в поддержании нативной конформации мембранной части белка было выполнено моделирование МД полноразмерного белка МАО А в воде (без бислоя) в течение 1,0 нс. Уже после первых 30 пс моделирования МД топология мембраносвязанного участка белка (α -спирали) нарушается. Система

МОДЕЛЬ БИСЛОЙНОЙ МЕМБРАНЫ С MAO A

достигла равновесия только когда α -спираль мембрано-связанного участка приблизилась к глобулярной части белка (рис. 7). Такое поведение мембранного белка в воде согласуется с ранее описанными аналогичными экспериментами [26].

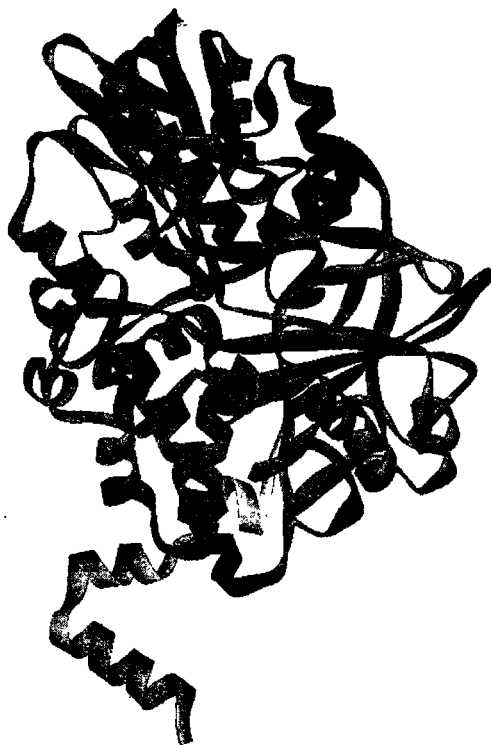


Рисунок 7.

Структура MAO A после 1,0 нс моделирования МД в воде.

Светлым обозначена мембрано-связанная часть белка MAO A, темным - водорастворимая часть белка MAO A.

Таким образом, построена модель липидного бислоя, которая хорошо согласуется со всеми известными экспериментальными данными (объем, площадь, занимаемые одной молекулой ДИФХ, а также изменение толщины бислоя, порядок ацильных цепей). На примере мембранного белка MAO A показано, что модель бислоя может быть успешно использована для моделирования и изучения топологии мембранных белков.

Работа была выполнена в рамках госконтракта с Федеральным агентством по науке и инновациям №43.071.1.1.1517 "Компьютерное конструирование физиологически активных веществ".

ЛИТЕРАТУРА

1. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235-242. (<http://www.rcsb.org/pdb/>)
2. Saiz L., Klein M.L. (2002) *Account of Chemical Research*, **6**, 482-489.
3. Forrest L.R., Sanson M.S.P. (2000) *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **10**, 174-181.
4. Tieleman D.P., Marrink S.J., Berendsen H. J.C. (1997), *Biochim. Biophys. Acta*, **1331**, 235-270.
5. Ma J., Yoshimura M., Yamashita E., Nakagawa A., Ito A., Tsukihara T. (2004) *J. Mol. Biol.*, **338**, 103-114.

6. Sybyl 6.9, Tripos Inc., (1699) South Hanley Road, St. Louis, Missouri, 63144, USA.
7. Berendsen, H.J.C., D. van der Spoel, van Drunen R. (1995) *Comp. Phys. Comm.*, **95**, 43-56.
8. Berger O., O. Edholm, F. Jahnig (1997) *Biophys. J.*, **72**, 2002-2013.
9. Berendsen, H.J.C., J.P.M. Postma, W. F. Van Gunsteren, A. DiNola, J.R. Haak (1984) *J. Chem. Phys.*, **81**, 3684-3690.
10. Nose. S. (1984) *Mol. Phys.*, **55**, 255-268.
11. Hoover W. G. (1985) *Phys. Rev.*, **31**, 1695-1697.
12. Lindahl E., Edholm O. (2000) *Biophys. J.*, **79**, 426-433.
13. Allen F. H. (2002) *Acta Cryst. B58*, 380-388. (<http://www.ccdc.cam.ac.uk>)
14. Heller. H., Schaefer M., Schulten K. (1993) *J. Phys. Chem.*, **97**, 8343-8360.
15. Marrink S.J., Berger O., Tieleman D.P., Jaehnig F. (1998) *Biophys. J.*, **74**, 931-943
16. Tieleman D.P., Berendsen H.J.C. (1996) *J. Chem. Phys.*, **105**, 4871-4880
17. Nagle J.F. (1993) *Biophys. J.*, **64**, 1476-1481.
18. Nagle J.F., Wiener M.C. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **942**, 1-10.
19. Franks N.P. (1977) *J. Mol. Biol.*, **100**, 345-358.
20. Egberts E., Marrink S. J., Berendsen H. J. C. (1994) *Eur. Biophys. J.*, **22**, 423-436.
21. Berneche S., Nina M., Roux B. (1995) *Biophys. J.*, **75**, 1603-1618.
22. Lafleur M., Cullis P.R., Bloom M. (1990) *Eur. Biophys. J.*, **19**, 55-62.
23. Seelig A., Seelig J. (1977) *J. Biochemistry*, **16**, 45-50
24. Seelig J., Seelig A. (1974) *Biochemistry*, **13**, 4839-4845.
25. Yamada M., Yasuhara H. (2004) *Neurotoxicology*, **25**, 215-221.
26. Dubovskii P.V., Li H., Takahashi S., Arseniev A.S., Akasaka K. (2000) *Protein Science*, **9**, 786-798.
27. Buldt G., Gally H. U., Seeling J., Zaccari G. (1979) *J. Mol. Biol.*, **134**, 673-691.

Поступила 02.04.2004

FULL ATOMIC COMPUTER MODEL OF DIPALMITOYLPHOSPHATIDYLCHOLINE BILAYER MEMBRANE

Yu. Yu. Smolinskaya, A. V. Veselovsky, A. S. Ivanov

Institute of Biomedical Chemistry, 10, Pogodinskaya st., Moscow, 119121 Russia,
tel.: 7(095)246-58-20, fax: 7(095)245-08-57, e-mail: ivanov@ibmh.msk.su

The present paper describes computer simulations of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayer. DPPC model was constructed from the crystal structures of choline, glycerophosphate and two fatty acid residues. DPPC structure was cloned and the model of lipid bilayer containing 338 DPPC molecules was designed. The molecular dynamics simulation of mixed system composed of DPPC bilayer and 30715 water molecules was performed during 3.5 ns. Some structural parameters like volume and area of bilayer, occupied by one lipid molecule, order parameter of the fatty acyl carbons and density profiles generated by the molecular dynamic simulation were in good agreement with known experimental data. The usefulness of the obtained membrane system for further modelling of membrane proteins topology was tested with monoamine oxidase A (MAO A) membrane topology simulation. Molecular dynamics simulation of lipid bilayer, MAO A and two water phases was carried out during 3.0 ns. Comparative analysis of the equilibrium model and membrane topology of MAO A with known the crystal structure has shown good agreement.

Key words: lipid bilayer, molecular dynamics simulation, computer model, dipalmitoylphosphatidylcholine, monoamine oxidase A, membrane protein