

УДК 53.072.001.57, 577.3

ПОСТРОЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МОДЕЛИ ФРАГМЕНТА ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЫ В ГЕЛЕВОМ И ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКОМ СОСТОЯНИЯХ

Д. В. Зленко, П. М. Красильников

(кафедра биофизики биологического факультета МГУ)

E-mail: zoidberg@erg.biophys.msu.ru

Построена модель липидной мембраны в жидкокристаллическом и гелевом состояниях. Модель мембраны в жидкокристаллическом состоянии адекватно воспроизводит геометрические параметры мембраны, упаковку липидов и параметры подвижности молекул. Модель мембраны в гелевом состоянии бислоя воспроизводит геометрические параметры реальной мембраны и упаковку липидов. Представлены новые методы расчета параметров подвижности молекул фосфолипидов в плоскости бислоя.

Введение

В настоящее время благодаря интенсивному развитию вычислительной техники все более активно используются методы компьютерного моделирования сложных систем, в том числе биологических макромолекул и их ансамблей. Одной из таких систем являются клеточные липидные мембраны, представляющие собой бислоенные молекулярные пленки, построенные из липидных молекул [1, 2]. Существенное значение в функционировании биомембран имеет фазовое состояние липидного бислоя, в частности гелевое и жидкокристаллическое [1, 2]. Детальное экспериментальное исследование различных фазовых состояний мембраны наталкивается на существенные трудности. В связи с этим для изучения липидных мембран большое значение приобретают методы численного моделирования, в частности метод молекулярной динамики (МД) [3–5].

В настоящей работе мы предприняли попытку создания корректной молекулярной модели фрагмента бислоенной липидной мембраны, позволяющей изучать свойства мембран в экспериментах *in silico*. Создание адекватной, т.е. устойчивой во времени и воспроизводящей экспериментально измеренные величины, модели липидного бислоя является актуальной задачей молекулярной биологии, так как использование только таких моделей позволяет получать значимые результаты.

Молекулярно-динамические расчеты

Модельная система состоит из 48 молекул дистеароилфосфатидилхолина (ДСФХ) и 1759 молекул воды (рис. 1). Полноатомная, с явно заданными атомами водорода модель молекулы ДСФХ была создана нами с нуля. Для квантовохимических расчетов параметров жесткости модельной молекулы

липиды использовался пакет PC GAMESS [6, 7]. Использование полноатомных моделей необходимо, так как структура мембраны во многом определяется свойствами гидрофобной области бислоя [1, 2], тем не менее неполноатомные модели используются [8, 9]. Такой подход частично оправдывается экономией вычислительных ресурсов, но является более грубым. В связи с этим мы использовали полноатомную модель молекул ДСФХ. Созданные модельные молекулы липидов были уложены в бислоенную гексагональную структуру [1] при помощи программ собственной разработки. Для воды была использована модель tip4p [3], в которой имеется дополнительная виртуальная частица, описывающая неподеленные электронные пары атома кислорода, что необходимо для корректного образования водородных связей.

Расчеты молекулярной динамики проводились с использованием пакета программ GROMACS [3–5]. Для корректности расчетов МД важным является выбор способа численного решения уравнений движения и подбор оптимального шага интегрирования. Для решения уравнений движения был выбран «стохастически-динамический» способ как наиболее физически адекватный [3]. Оптимальный шаг интегрирования был определен как наибольший из возможных, для которых результат расчета устойчиво воспроизводился вне зависимости от начальных условий. Анализ показал, что при шаге интегрирования $\tau \leq 0.25$ фс средняя энергия деформации углов и связей модельных молекул практически не зависит от начальных условий. Шаг интегрирования был выбран равным 0.25 фс, поскольку выбор меньшего шага влечет за собой излишние затраты вычислительных ресурсов. Контроль адекватности модели производился на основании следующих критериев: распределение энергии системы по различным степеням свободы должно быть равномерным;

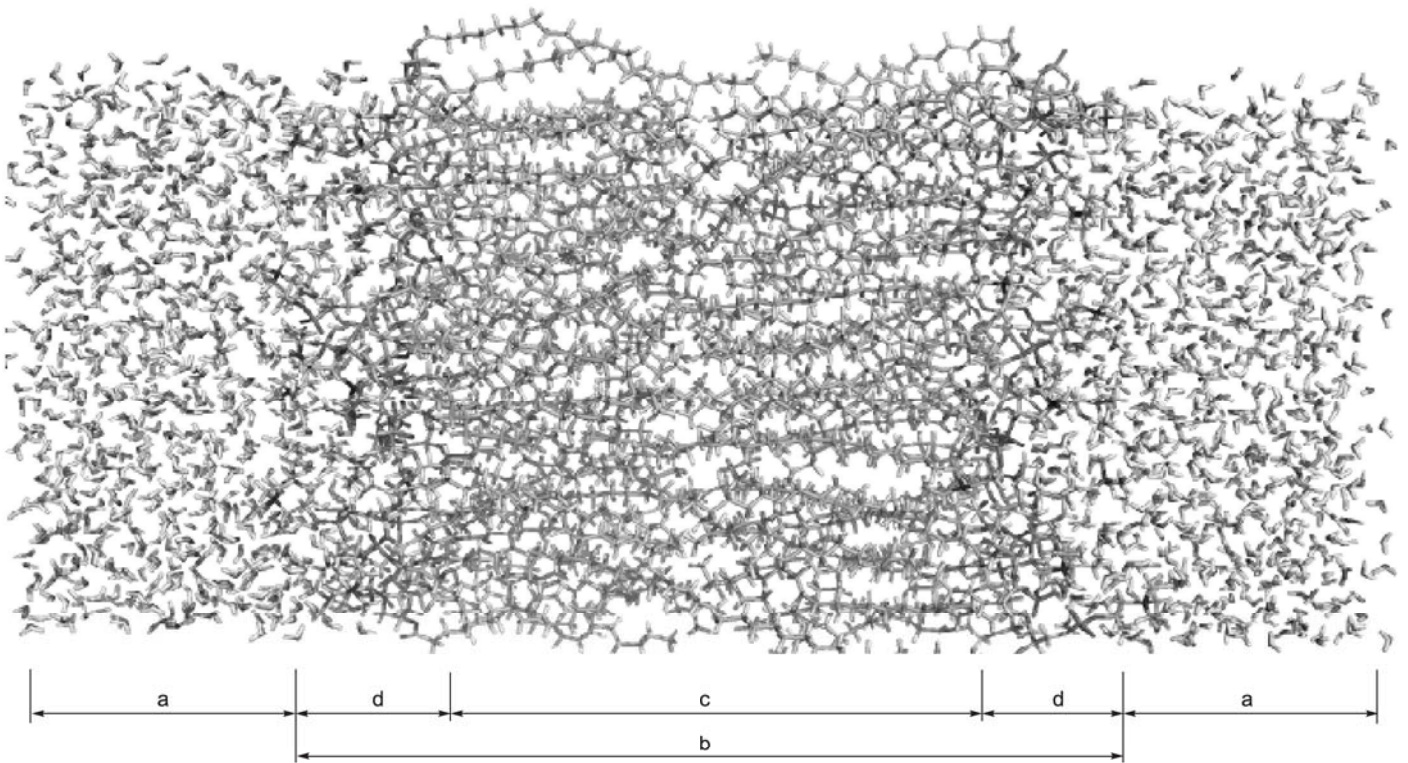


Рис. 1. Общий вид молекулярной модели участка липидной мембраны в жидкокристаллическом состоянии, окруженной водой. Модельная система состоит из 48 молекул дистеароилфосфатидилхолина и 1759 молекул воды. На рисунке отмечены: a — вода (~ 20 Å), b — липидная мембрана (~ 65 Å), c — гидрофобная область бислоя (~ 35 Å) и d — полярные головки липидов (~ 15 Å)

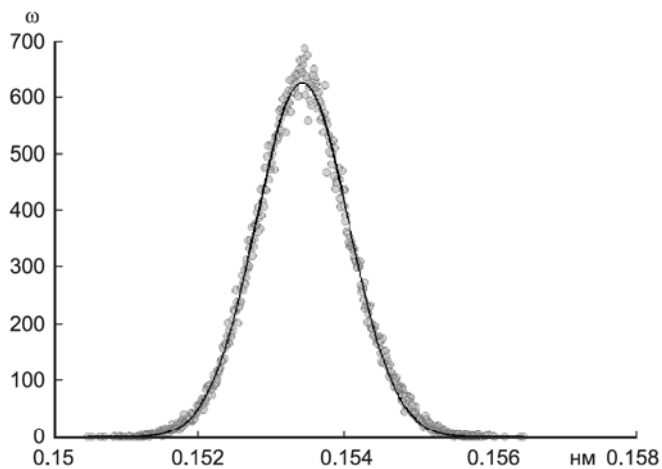


Рис. 2. Распределение длин всех углеводородных связей С–С модельной молекулярной системы. Интегральное среднее значение потенциальной энергии деформации углов, рассчитанное для модели, составляет 0.46 кДж/моль. Это значение хорошо согласуется с энергией, даваемой статистической термодинамикой, $\frac{1}{2}RT = 0.42$ кДж/моль. Сглаженная кривая (—) представляет гауссову функцию, полученную при регрессионном анализе экспериментальных данных (o)

средняя энергия, приходящаяся на одну степень свободы системы, должна составлять $\frac{1}{2}kT$. Нам удалось достичь удовлетворительного соответствия модельной системы этим критериям (рис. 2).

Для уравнивания модели был проведен десятинаносекундный релаксационный расчет МД, финальные координаты атомов которого использовались в качестве исходных для дальнейших расчетов. В результате релаксации мембрана приобрела устойчивую конформацию, характерную для реальных мембран. Параметры воды также достигли устойчивых реалистичных значений: плотность воды составила ~ 1 г/см³, коэффициент самодиффузии воды $\sim 10^{-5}$ см²/с. Более того, над поверхностью мембраны образовался слой малоподвижной воды, имеющий толщину порядка нескольких ангстрем и коэффициент самодиффузии на два порядка ниже, чем в объемной фазе ($\sim 10^{-7}$ см²/с). Такие параметры находятся в полном согласии с экспериментом [10] и свидетельствуют об адекватности модели.

Методы оценки молекулярной подвижности

Латеральная диффузия. В случае липидного бислоя интерес представляет диффузия молекул липида в плоскости мембраны [11]. Малые перемещения липидов вдоль нормали к бислою носят колебательный характер и не могут рассматриваться как диффузионные [12]. Экспериментальное исследование диффузионных процессов в липидных мембранах связано с усреднением по большим ансамблям частиц и временам порядка секунд [1].

В рамках же метода МД доступны времена порядка 10 нс, а количество наблюдаемых частиц измеряется сотнями или тысячами. Поэтому из МД расчетов можно получить лишь оценку коэффициентов диффузии D .

Допустим, имеется группа молекул липида. В процессе диффузии расстояние между молекулами будет расти: $\langle R^2 \rangle = 4Dt$, где R — смещение центра масс (ЦМ) молекулы, а t — время. Множитель 4 связан с двухмерностью диффузионного пространства. Рассмотрим дисперсию распределения группы молекул липида по расстоянию до общего ЦМ, $\sigma^2 = \frac{1}{n} \sum R_i^2$, где n — число частиц, а R_i — расстояние ЦМ липида до общего центра масс. В данном случае двухмерность пространства учтена при усреднении по ансамблю частиц, следовательно, дисперсия $\sigma = Dt$, а тангенс угла наклона на графике (σ^2, t) является D . Так как исследуемая модельная система содержит только 48 молекул липида, то для эффективного увеличения исследуемого ансамбля частиц липиды были случайным образом сгруппированы в несколько (~ 100) групп. После усреднения по всем группам (σ^2, t) хорошо аппроксимируется прямой во всех рассматриваемых диапазонах времен (рис. 3), что позволяет оценить D .

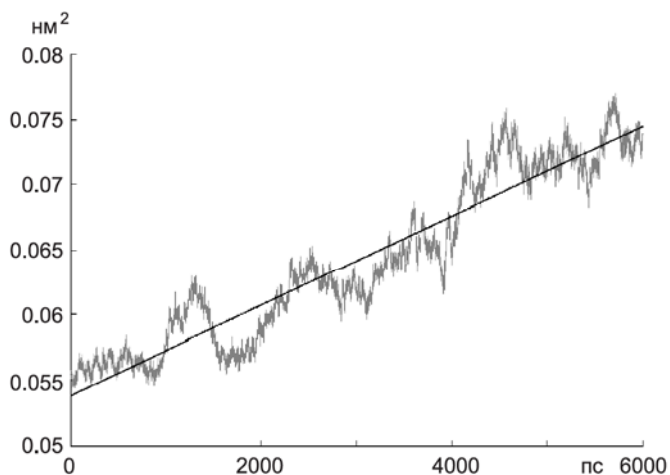


Рис. 3. Зависимость дисперсии центров масс группы молекул ДСФХ от времени. Каждая точка получена усреднением по 10^2 измерениям. Тангенс угла наклона прямой соответствует коэффициенту латеральной диффузии липидов $D = 1.46 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$

Вращательная диффузия. Можно считать, что вращение молекул липида происходит только вокруг длинной оси молекулы, так как вращение вокруг двух других осей сопряжено с нарушением бислоидной структуры и крайне затруднено [1, 12]. Мы вели наблюдение за вращением вектора, связывающего ЦМ ацильных хвостов молекулы липида. Для описания интенсивности вращательного движения в эксперименте используют время вращательной

корреляции (τ), отражающее характерное время, необходимое молекуле или ее части для поворота на угол $\frac{\pi}{2}$ [1, 2]. Мы разработали метод оценки этого параметра.

Рассмотрим распределение молекул липида по углу поворота относительно начального положения. В начальный момент времени углы поворота молекул равны нулю, распределение представляет δ -функцию. С течением времени молекулы поворачиваются и распределение молекул по углу поворота уширяется. По мере размывания распределения границы доверительного интервала для среднего значения угла будут расти (рис. 4). Момент времени, к которому границы доверительного интервала ($\alpha = 50\%$) для среднего угла поворота достигают $\pm \frac{\pi}{4}$, мы использовали в качестве оценки τ , так как это время, за которое в среднем одна половина молекул повернется относительно другой половины на угол $\frac{\pi}{2}$. Для увеличения выборки и получения более репрезентативных результатов были использованы различные группы молекул липидов (~ 100) с различными стартовыми точками.

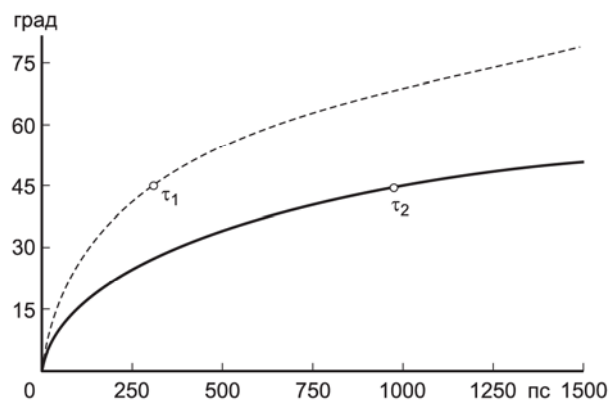


Рис. 4. Временная зависимость положения границ симметричного доверительного интервала ($\alpha = 50\%$) для математического ожидания распределения молекул ДСФХ по углу поворота относительно начального положения. Графики построены для полярных головок (---) и ацильных хвостов молекул ДСФХ (—). Отмечены точки, в которых граница доверительного интервала достигает значения $\pi/4$, соответствующего временам вращательной корреляции, составляющим $\tau_1 = 311$ пс и $\tau_2 = 974$ пс для полярных головок и ацильных хвостов соответственно

Модель жидкокристаллического состояния

Из эксперимента известно, что для ДСФХ мембраны в жидкокристаллическом (ЖК) состоянии характерны следующие геометрические параметры. Средняя площадь, приходящаяся на молекулу липида составляет $\sim 52 \text{ \AA}^2$ [1, 2]. Толщина гидрофобной части бислоя $\sim 32 \text{ \AA}$. Также известно, что ацильные хвосты молекул липида не упорядочены [1, 13]. Коэффициент латеральной диффузии липи-

дов в ЖК-фазе составляет $\sim 10^{-8}$ см²/с, а τ имеет среднюю величину 100–1000 пс [1, 2].

Для нашей модели жидкокристаллического состояния характерны следующие равновесные параметры. Средняя площадь, приходящаяся на молекулу ДСФХ, составила 48.7 Å². Среднее по нормали расстояние между атомами фосфора в противоположных монослоях составило 35.3 Å. Ацильные хвосты молекул липидов разупорядочены. Коэффициент латеральной диффузии равняется $(1.46 \pm 0.22) \cdot 10^{-8}$ см²/с. Время вращательной корреляции составило 974 ± 238 пс. Равновесные параметры модельной системы удовлетворительно согласуются с данными реального эксперимента (таблица). Это свидетельствует о том, что модель достаточно корректна для исследований процессов, протекающих в липидных мембранах. В частности, полученная модель может быть использована для исследований подвижности молекул липидов, а также их взаимодействия друг с другом.

Модель гелевого состояния

Экспериментально показано, что для фосфатидилхолинов (ФХ) в гелевом состоянии средняя площадь, приходящаяся на липид, составляет ~ 40 – 45 Å² [1, 14, 15]. Толщина гидрофобной части ДСФХ бислоя в гелевой фазе в литературе не обнаружена, но ее можно оценить, опираясь на параметры других ФХ. Толщина гидрофобной части бислоя из димеристеарилфосфатидилхолина (ДМФХ) в гелевой фазе составляет ~ 30 Å [14]. Для дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) этот параметр ~ 40 Å [15], что позволяет оценить толщину гидрофобной области ДСФХ как ~ 50 Å [13, 16]. Также известно, что гидрофобные участки молекул ФХ в гелевой фазе наклонены относительно нормали к бислою на угол $\sim 12^\circ$ [1, 14, 15].

Для создания модели гелевой фазы необходимо расположить остатки жирных кислот строго определенным способом. Причем экспериментально известны лишь общие принципы расположения ДСФХ в гелевой фазе [14, 15], в то время как точные параметры упаковки липидов неизвестны. В таком положении физически наиболее разумным способом создания модели гелевого состояния было бы аккуратно заморозить модельную ЖК-мембрану. Но в рамках метода МД это невозможно из-за большой (порядка мс) длительности фазового перехода [1, 2]. Из литературы известно, что при увеличении давления существенно повышаются температура плавления липидных мембран [1, 17], соответственно увеличивается и скорость протекания фазового перехода, чем мы и воспользовались. Для ускорения перехода в гелевое состояние давление в модельной системе было ступенчато увеличено до 10^5 бар с промежуточной релаксацией системы при повышенном давлении. Затем температура была

поднята до 600К и проведен десятинаносекундный расчет при тангенциальном давлении 10^5 бар, нормальное к бислою давление при этом равнялось атмосферному. По окончании расчета температура была уменьшена до 300 К, а тангенциальное давление ступенчато приведено в норму.

После нормализации давления модельная липидная мембрана приобрела следующие геометрические параметры:

- ацильные хвосты вытянуты и плотно упакованы;
- средняя площадь, приходящаяся на молекулу липида, — 34.1 Å²;
- среднее по нормали к бислою расстояние между атомами фосфора в разных монослоях составило 53 Å;
- наклон ацильных цепей относительно нормали к бислою составил примерно 10° .

Такие значения характерны для реальных ДСФХ мембран в гелевом состоянии (таблица).

Геометрические и динамические характеристики мембраны ДСФХ в гелевом и жидкокристаллическом состоянии

	Жидкокристаллическое состояние		Гелевое состояние	
	модель	эксперимент	модель	эксперимент
S , Å ²	48.7	52	34.1	~ 40
L , Å	35.3	32	53	~ 50
α , град	—	—	10	12
D , см ² /с	$1.46 \cdot 10^{-8}$	$\sim 10^{-8}$	$\sim 10^{-9}$	$\sim 10^{-12}$
τ , с	$\sim 10^{-10}$	$\sim 10^{-10}$	$\sim 10^{-9}$	$\sim 10^{-6}$

Представлены величины, рассчитанные для модели, и экспериментальные данные: S — средняя площадь, приходящаяся на липидную молекулу; L — толщина гидрофобной области бислоя; α — угол наклона ацильных цепей в гелевом состоянии; D — коэффициент латеральной диффузии; τ — время вращательной корреляции.

Коэффициент латеральной диффузии, рассчитанный для модели гелевого состояния, составил $D \sim 10^{-9}$ см²/с, а время вращательной корреляции $\tau \sim 10^{-9}$ с. Полученные оценки параметров подвижности существенно больше, чем следует из эксперимента, что свидетельствует об отличии модели от равновесного гелевого состояния ДСФХ бислоя (таблица). В ходе расчетов МД мы обнаружили, что при температуре 300 К, которая ниже температуры фазового перехода в реальных ДСФХ мембранах (53°C [18]), все параметры модельной системы стремятся к значениям, характерным для ЖК-фазы. Это может означать, что в ходе подготовки модели гелевого состояния молекулярная система не претерпела фазовый переход полностью и в структуре бислоя сохранились дефекты. Наличие дефектов может быть причиной неустойчивости модели, так как она очень мала (48 молекул ДСФХ), т.е. по сути является лишь зародышем гелевой фазы и чув-

ствительна к любым малым тепловым флуктуациям. Другая причина неустойчивости модели гелевого состояния заключается в особенностях метода МД. В процессе численного интегрирования уравнений движения возникают ошибки. Накапливаясь, эти ошибки приводят к постепенному разогреву модельной системы. Для компенсации этого негативного эффекта используется алгоритм отвода излишков энергии (термостат) [4, 5]. Возможно, переход модельной системы из гелеподобного в ЖК-состояние связан с тем, что лишняя энергия не только отводится термостатом, но и расходуется на плавление мембраны.

Заключение

Сравнение оценок параметров модельной бислойной мембраны с экспериментально измеренными величинами (таблица) показывает, что модельная система в ЖК-состоянии хорошо описывает реальную мембрану ДСФХ. В созданной модели хорошо воспроизводится геометрическая структура бислойной мембраны и упаковка липидов. Кроме того, в модели получены реалистичные оценки коэффициента латеральной диффузии и времен вращения релаксации молекул ДСФХ.

Созданная модель гелевого состояния бислоя по своим геометрическим характеристикам соответствует реальной мембране. Однако подвижность молекул липида в модели гелевого состояния оказалась существенно выше, чем в реальных мембранах. Кроме того, с течением времени геометрические параметры модели гелевого состояния со временем релаксируют к значениям, характерным для ЖК-фазы. Мы предполагаем, что наблюдающаяся неустойчивость модели связана с недостаточными размерами систем доступных для МД расчета. Размеры созданной нами модели соответствуют зародышу гелевой фазы, следовательно, она чувствительна к любым случайным флуктуациям. Кроме того, неустойчивость модели гелевого состояния связана с численными ошибками дискретной процедуры интегрирования уравнений движения и функционированием процедуры термостатирования. Мы предполагаем, что накапливающаяся вследствие ошибок интегрирования энергия не полностью отбирается термостатом, а частично расходуется на плавление неустойчивого зародыша гелевой фазы.

Хорошее соответствие между моделью ЖК-фазы и реальными мембранами позволяет использовать

эту модель для исследования липидных мембран. Созданная модель позволяет изучать динамическое поведение отдельных молекул ДСФХ с пикосекундным временным разрешением, что недоступно прямому эксперименту. Кроме того, для конструирования гелевой фазы создан физически адекватный метод, позволивший наблюдать перестройку геометрической структуры бислойной мембраны из ЖК в гелевое состояние, что позволит в дальнейшем моделировать фазовые переходы в липидных мембранах.

Литература

1. *Генис Р.Б.* Биомембраны. М., 1997.
2. *Mouritsen O.G.* LIFE — AS A MATTER OF FAT. Berlin; Heidelberg, 2005.
3. *Spoel D., van Buuren A.R., Berendsen H.J.C.* et al. Gromacs User Manual. <ftp://ftp.gromacs.org/pub/manual/manual-3.3.pdf>, ver. 3.3.
4. *Berendsen H.J.C., Spoel D., van Drunen R.* // *Comp. Phys. Comm.* 1995. **91**. P. 43.
5. *Lindahl E., Hess B., van der Spoel D.* // *J. Mol. Mod.* 2001. **7**. P. 306.
6. *Granovsky A.A.* PC GAMESS ver. 7.1. <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>.
7. *Nemukhin A.V., Grigorenko B.L., Granovsky A.A.* // *Moscow University Chem. Bull.* 2004. **45**, N 2. P. 75.
8. *Smondyrev A.M., Berkowitz M.L.* // *Biophys. J.* 2000. **78**. P. 1672.
9. *Pitman M.C., Grossfield A., Suits F., Feller S.E.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. **127**. P. 4576.
10. *Stern. O.* // *Z. Elektrochem.* 1924. **30**. P. 508.
11. *Singer S.J., Nicolson G.L.* // *Science.* 1978. **175**. P. 720.
12. *Намуот В.А.* // *Биофизика.* 1986. **XXXI**, № 3. С. 449.
13. *Ipsen J.H., Mouritsen O.G., Bloom M.* // *Biophys. J.* 1990. **57**. P. 405.
14. *Tristram-Nagle S., Liu Y., Legleiter J., Nagle J.F.* // *Biophys. J.* 2002. **83**. P. 3324.
15. *Wiener M.C., Suter R.M., Nagle J.F.* // *Biophys. J.* 1989. **55**. P. 315.
16. *Lewis B.A., Engelman D.M.* // *J. Mol. Biol.* 1983. **166**. P. 211.
17. *Chong P.L.G., Fortes P.A.G.* // *Biochem.* 1983. **22**. P. 5544.
18. *Ali S., Minchey S., Janoff A., Mayhew E.* // *Biophys. J.* 2000. **78**. P. 246.

Поступила в редакцию
09.01.2008