

На правах рукописи

Антонов Михаил Юрьевич

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ И
ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР**

Специальность: 03.00.02. – “Биофизика”

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени кандидата
физико-математических наук

Москва
2008

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, профессор
Шайтан Константин Вольдемарович

Официальные
оппоненты: доктор физико-математических наук
Крупянский Юрий Федорович
(ИХФ им. Н.Н. Семенова РАН)

кандидат физико-математических наук
Иванов Виктор Александрович
(физический факультет МГУ им М.В,
Ломоносова)

Ведущая организация: Институт математических проблем биологии
РАН, г. Пущино

Защита состоится “__” _____ 2008 г. в __:__ на заседании
Диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном
университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, г. Москва, Ленинские
горы, МГУ, биологических факультет, кафедра биофизики, аудитория
“новая”.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического
факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан: “__” _____ 2008 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук,
профессор

Т.Е. Кренделева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Биологические мембраны являются важнейшим структурным компонентом живой клетки, выполняя барьерную и транспортную функции, благодаря которым происходит обмен частицами между внутриклеточной и внеклеточной средой. С молекулярной точки зрения подобные системы являются довольно сложными и, несмотря на прогресс сделанный в этой области и накопленный опыт, имеющиеся знания о фундаментальных основах динамического поведения и структурно – функциональных взаимосвязей возникающих в подобных системах являются не вполне полными. Методы вычислительного эксперимента (молекулярной динамики, МД) уже довольно давно доказали свою эффективность в исследовании биологических объектов (Н.К.Балабаев, Р.Г.Ефремов, А.Л.Рабинович, К.В.Шайтан и др.). В связи с этим, особый интерес представляет применение компьютерного моделирования для изучения сложных систем, имитирующих поведение биологических мембран клеток. В данной работе используется метод МД для изучения зависимостей между динамическими и диффузионными свойствами липидного бислоя и его липидным составом, а также применяется метод управляемой (направленной) молекулярной динамики (SMD), для детального изучения процессов диффузии низкомолекулярных соединений через липидный бислой. В рамках этого подхода, к изучаемой системе прикладываются дополнительные силы, стимулирующие движения по выбранным степеням свободы, что позволяет за разумное время вычислительного эксперимента дать количественную оценку параметрам, характеризующим физические механизмы диффузии в микрогетерогенных структурах, сопоставимые с экспериментальными данными.

Целью работы является разработка методов и протоколов для изучения методом МД систем гидратированных липидных бислоев различного состава, на примере бислоев липидов 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (ПОФХ), 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (ДПФХ), 1,3-(1-стеароил-2-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидил)-глицерина (Кардиолипин, КЛ), выявление зависимостей динамических свойств бислоя от его липидного состава, изучение диффузии низкомолекулярных соединений в этих системах, а также изучение возможностей приложения разрабатываемых методов и протоколов к моделированию динамики ряда пептидных структур.

Постановка задачи. Для достижения этих целей необходимо было поставить и решить следующие основные задачи:

- Разработать необходимые программные компоненты для конструирования мембранных структур и проведения численных экспериментов классической и управляемой молекулярной динамики и обработке результатов.

- Разработать протоколы МД и SMD для мембранных систем, позволяющих получать локально равновесные системы, характеризуемые физически обоснованными величинами вычисляемых параметров и сравнимых с экспериментом.
- Провести сравнительное изучение динамических и диффузионных параметров рассматриваемых систем.
- Провести анализ анизотропности диффузионных характеристик бислоя.
- Изучить диффузию малых молекул в простейшей гидрофобной мембране. Провести анализ распределений различных типов атомов, а также некоторых аминокислотных остатков между водой и гидрофобной фазой.

Научная новизна. Впервые

- для бислоев различного состава разработан протокол МД, приводящий в полноатомном приближении к одновременно правильным значениям плотности и коэффициентов диффузии для бислоев с различным липидным составом
- проведено сравнительное изучение динамических и диффузионных характеристик бислоев определенного различного липидного состава
- проведено сравнительное изучение диффузии низкомолекулярных соединений различной химической природы через липидные мембраны
- разработаны алгоритмы и новые программные средства, для конструирования мембранных структур, проведения и визуализации МД эксперимента, получения и обработки данных эксперимента

В ходе работы разработаны методы и программные компоненты, предназначенные для подготовки данных, проведения, обработки и автоматизации обработки результатов МД эксперимента, которые могут быть использованы для молекулярного дизайна биоструктур в исследовательских задачах и в учебном процессе.

Достоверность результатов диссертации обеспечивается использованием универсальных законов и уравнений классической и квантовой механики и проведением тестовых расчетов систем, сравниваемых с экспериментальными данными.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на 4-й всероссийской школе-симпозиуме «Динамика и структура в химии и биологии» (Москва, 2006 г.), Международной конференции «Ломоносов 2006» (Москва, 2006 г.), Рабочем совещании по компьютерному моделированию конденсированных фаз включая биосистемы (Москва, 2006 г.), Международной конференции «Ломоносов 2007» (Москва, 2007 г.), биотехнологической выставке-ярмарке «РосБиоТех-2007» (Москва, 2007 г.). Доклады о результатах работы были представлены на семинарах кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, включая 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для соискателей ученых степеней, 2 статьи находятся в печати. На разработанный программный продукт оформлены 2 свидетельства о регистрации программ.

Личный вклад автора. Соискатель принимал непосредственное участие в постановке задач, проведении расчетов их обработке и анализе, подготовке статей и докладов на конференциях, а так же в разработке программного обеспечения для проведения, обработки и анализа результатов МД эксперимента.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа (___ страниц) состоит из введения, ___ глав, выводов, списка литературы (___ ссылки), иллюстрирована ___ рисунками и содержит ___ таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы задачи работы, кратко охарактеризованы методы их решения, отражены научная новизна и практическая значимость результатов.

В первой главе представлен краткий обзор литературы по динамике мембранных систем и методам молекулярной динамики. Проведен анализ возможностей различных методов.

Во второй главе описаны основные методики проведения вычислительного эксперимента, метод молекулярной динамики и методики экспериментальных исследований для изучения динамики биомембран и диффузионных процессов в биомембранных системах. Также приведены данные по используемым в работе методам квантовой химии для расчета парциальных зарядов в молекулах.

В третьей главе в полноатомном силовом поле, исследована динамика анизотропных мембранных структур на примере трех гидратированных бислоев различного липидного состава и проведено сравнительное изучение характеризующих их параметров.

Для проведения расчетов использовался оригинальный пакет PUMA-B с графическим интерфейсом PUMA-GUI, решение классических уравнений производилось с использованием алгоритма Верле, в полноатомном силовом поле Amber-99. Исследовались модели мембран состоящие из липидов в различных пропорциях: 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (ПОФХ), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (ДПФХ), 1,3-(1-стеароил-2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидил)-глицерин (кардиолипин, КЛ). В системах, содержащих КЛ, отрицательный заряд компенсировался добавлением в воду ионов натрия. Расчетная ячейка, в различных системах содержала 40-64 молекулы липида. Степень сольватации составляла не менее 32 молекул воды на липид, что является достаточным для полного гидратирования липидных головок. Состав исследуемых систем представлен в Табл. 1. Расчет проводился в периодических граничных условиях. Начальная (стартовая) структура бислоев собиралась по оригинальной методике с использованием специально разработанного программного обеспечения, позволяющей минимизировать

возможную симметрию начальной конфигурации липидного слоя. Для этого, молекулы липидов при сборке предварительно поворачивались вокруг своей длинной оси на случайный угол от 0 до 2π , что позволяет повысить начальную степень неупорядоченности системы и избежать возможных артефактов в МД эксперименте. На Рис. 5. приведена стартовая конфигурация первой модельной системы.

Парциальные заряды атомов в липидах оценивались с использованием неограниченного метода Хартри-Фока, базиса 6-31G* и метода Малликена. Использовалась модель воды TIP3P. Валентные связи и валентные углы в молекулах воды и липидов не фиксировались. В стартовой конфигурации молекулы воды помещались на расстоянии не менее 2.3 Å от крайних атомов мембраны.

Радиус обрезания кулоновских взаимодействий составлял 16-20 Å. Обрезание ван-дер-ваальсовых взаимодействий проводилось путем умножения потенциалов Леннард-Джонса на полиномиальную сглаживающую (переключающую) функцию с началом включения функции при 15 Å и полным выключением потенциала при 16 Å. Диэлектрическая проницаемость для кулоновских сил равнялась 1. Шаг интегрирования – 1 фс.

Исследуемая система	Состав
1	8 молекул КЛ 16 молекул ПОФХ 16 молекул ДПФХ 1336 молекул воды 16 молекул Na ⁺
2	30 молекул ПОФХ 30 молекул ДПФХ 1920 молекул воды
3	64 молекулы ПОФХ 2792 молекулы воды

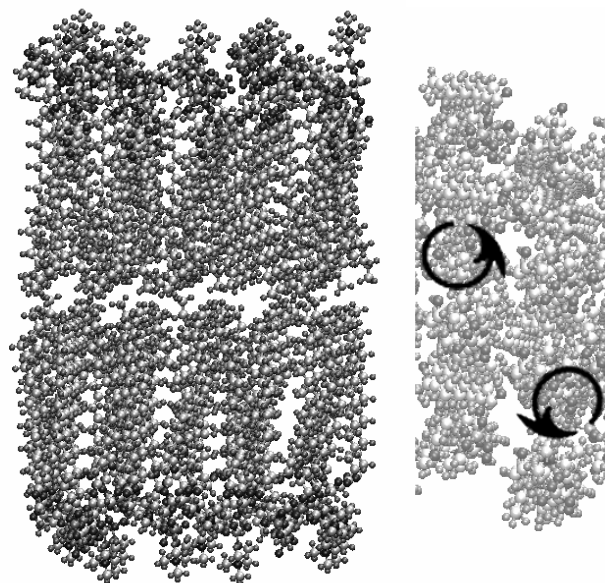


Табл. 1. Состав исследуемых систем.

Рис. 1. Начальная конфигурация системы 1.

Расчет проводился при постоянных температуре и объеме (NVT - ансамбль), а также при постоянных температуре и давлении (NPT - ансамбль). Температура в зависимости от стадии эксперимента, выбиралась от 300 К до 2000 К. Для поддержания постоянной температуры среды использовалась виртуальная столкновительная среда (столкновительный термостат), с массой виртуальных частиц 1 а.е.м. и средней частотой столкновений с атомами системы 10 пс⁻¹. Для поддержания условия постоянного давления использовался баростат Берендсена.

Система изначально приготавливалась в молекулярном конструкторе так, чтобы удельная площадь, приходящаяся на молекулу липида, соответствовала экспериментальным данным и составляла в течение расчета для ПОФХ 62–68 Å², для ДПФХ 59–62 Å², для КЛ 100–120 Å². В случае бислоев из разных липидов стартовая удельная площадь вычислялась как среднее взвешенное площадей участвующих липидов согласно их концентрации.

На первом этапе эксперимента проводилась ступенчатая релаксация бислоя в течение 200–500 пс при температуре 500–2000 К. Затем проводился набор рабочего участка МД траектории в течение не менее 2 нс. Во время расчета, к системам прилагалось отрицательное давление в латеральной плоскости, необходимое для поддержания средней удельной площади на молекулу липида на начальном уровне. Определение величины необходимого давления производилось на этапе приготовления состояния мембраны, на протяжении набора рабочего участка траектории, параметры баростатирования не изменялись.

Методами МД для полностью гидратированных бислоев ПОФХ определены, в частности, следующие параметры: поверхностная плотность мембраны, толщина бислоя, распределение атомных групп относительно нормали к мембране (Рис. 2), радиальные функции распределения атомов азота и фосфора в плоскости бислоя, параметры порядка для ацильных цепей липидов. При этом не было выявлено значительных расхождений для профилей электронной плотности и параметров порядка с результатами известных экспериментальных исследований и численных расчетов, использующих несколько иные методики.

Показано, что использование столкновительного термостата и баростата Берендсена с анизотропным баростатированием, а также переключающей функции для обрезания невалентных взаимодействий позволяет компенсировать как эффекты поверхностного натяжения, так и естественные погрешности параметризации силового поля для рассматриваемых систем.

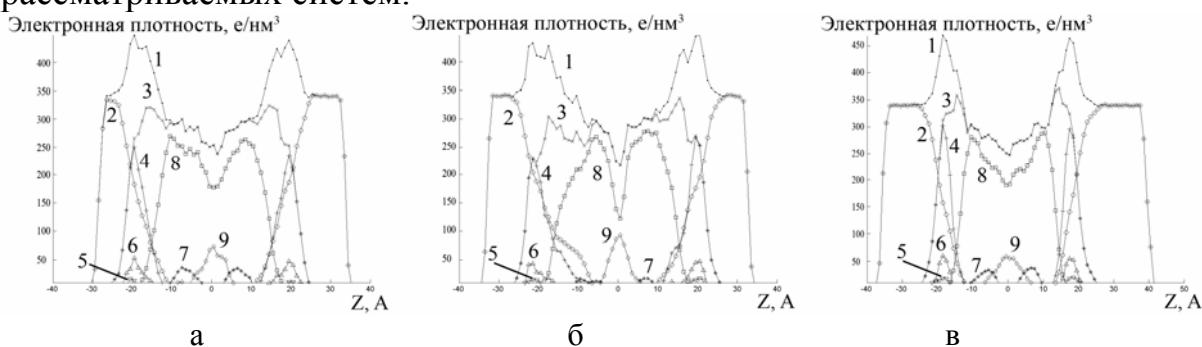


Рис. 2 Распределение электронной плотности в системе I (а), II (б), III (в). 1 — система в целом, 2 — вода, 3 — липид, 4 — липидные головы, 5 — атомы азота, 6 — атомы фосфора, 7 — HC=CH-группы, 8 — CH₂-группы алкильных цепей, 9 — концевая CH₃-группа алкильных цепей.

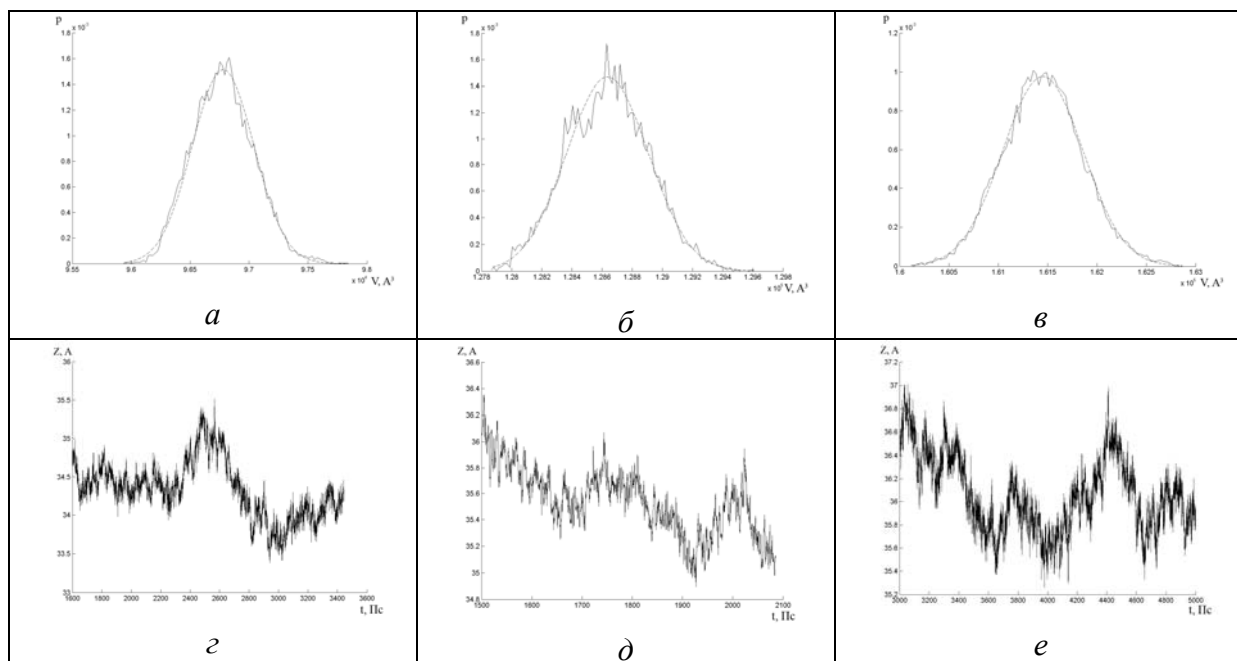


Рис. 3. Параметры расчетной ячейки, *a–в* — плотность вероятности значений объема расчетной ячейки, и гауссовская аппроксимация кривой; *г–е* — флуктуации толщины бислоя для систем I–III соответственно. Приведен рабочий участок траектории. Средние значения параметров расчетной ячейки приведены в Табл. 2.

Система	Средняя удельная площадь, Å^2	Среднее значение толщины мембраны, Å	$\chi_T, \text{Па}^{-1}$	Латеральное давление, бар
I	78.0 ± 5.5	34.33 ± 0.39	$1.7 \cdot 10^{-10}$	-242
II	65.4 ± 1.5	35.54 ± 0.25	$1.4 \cdot 10^{-10}$	-300
III	66.8 ± 3.7	36.06 ± 0.32	$2.1 \cdot 10^{-10}$	-265

Табл. 2. Средние значения параметров расчетной ячейки.

Использование данного МД-протокола позволяет получить мембранную структуру в согласии с данными эксперимента по удельной площади липидов, толщине и коэффициенту сжимаемости мембраны (Рис. 3, Табл. 2). Также следует отметить, что выявлено изменение в сторону понижения средней толщины мембраны, при увеличении в ее составе доли ненасыщенных липидов, что вполне соответствует существующим представлениям и экспериментальным наблюдениям.

Исследование радиальной функции распределения для атомов азота и фосфора (Рис. 4.), не выявляет дальнего порядка в упаковке голов липидов, в том числе на расстояниях порядка радиуса обрезания кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, что может говорить о том, что использование переключающей функции и достаточно больших радиусов обрезания, способно минимизировать эффекты от обрезания невалентных взаимодействий.

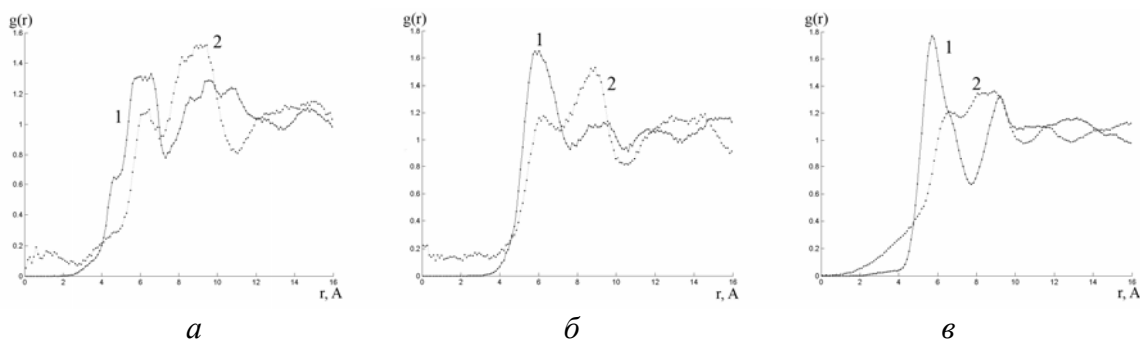


Рис. 4. Радиальные функции распределения атомов азота и фосфора в плоскости мембраны в системе I (а), II (б), III (в). 1 – P-P, 2 – N-N.

Измерения среднеквадратического смещения липидов приведены на Рис. 5. Коэффициент латеральной диффузии вычислялся в соответствии с соотношением Эйнштейна $\langle R^2 \rangle = 2 \cdot L \cdot D \cdot t$. Здесь $\langle R^2 \rangle$ – среднеквадратичное смещение геометрического центра липида, L – число поступательных степеней свободы системы, D – коэффициент диффузии, t – время. Усреднение коэффициента латеральной диффузии проводилось как по всем липидам заданного типа, так и по всем возможным отрезкам заданной длины τ траектории. Для того, чтобы в смещении липида не учитывалось движение бислоя как целого, положение центра массы бислоя фиксировалось. Вычисленные значения коэффициента латеральной диффузии (Табл. 3.) близки к данным по квазиупругому рассеянию нейтронов на бислоях ПОФХ и ДПФХ. Следует отметить, что сравнение результатов, полученных на временах менее 1 нс, наиболее корректно именно с данными по рассеянию нейтронов. Согласно современным представлениям, диффузия на больших временах, по всей видимости, затрагивает более крупномасштабные перестройки в структуре липидной матрицы, включающие коллективные перегруппировки липидов. Поэтому коэффициенты диффузии, измеренные другими методами (известны данные флуоресцентных и ЯМР измерений), оказываются в 2–10 раз ниже.

Латеральная подвижность липидов слабо убывает в ряду ДПФХ–ПОФХ–КЛ в соответствии с увеличением объема молекулы (в случае ПОФХ и КЛ) и добавлением двойной связи (в случае ПОФХ). Однако обращает внимание малая чувствительность коэффициента латеральной диффузии к структуре липида. Это показывает, что на временах порядка сотен пикосекунд механизм диффузии заключается не в смещении молекулы липида как целого, а в поэтапном и мелкомасштабном смещении отдельных звеньев, по-видимому, в небольших пределах.

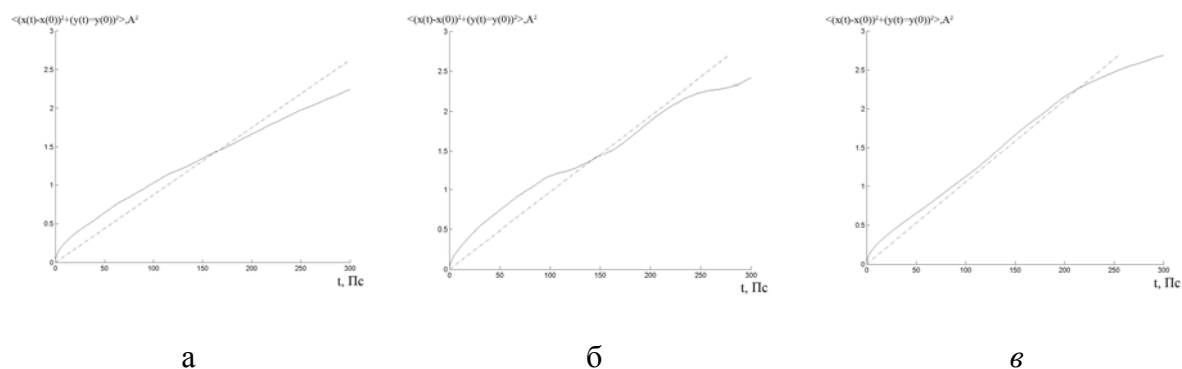


Рис. 5. Средний квадрат смещения геометрического центра липида ПОФХ в плоскости бислоя и его линейная аппроксимация в системах I (а), II (б), III (в)

Система	Липид	D_{xy} , см ² /с	Экспериментальные значения, см ² /с
I	ПОФХ	$(2.2 \pm 0.3) \cdot 10^{-7}$	—
I	ДПФХ	$(2.2 \pm 0.5) \cdot 10^{-7}$	—
I	КЛ	$(2.0 \pm 0.3) \cdot 10^{-7}$	—
II	ПОФХ	$(2.4 \pm 0.6) \cdot 10^{-7}$	—
II	ДПФХ	$(2.6 \pm 0.7) \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$ *
III	ПОФХ	$(2.6 \pm 0.5) \cdot 10^{-7}$	$2.0-2.5 \cdot 10^{-7}$

* Значение приведено для монолипидного бислоя

Табл. 3. Вычисленные значения коэффициента латеральной диффузии

В четвертой главе исследована проницаемость липидных бислоев для набора малых лигандов (Рис. 6.). Поскольку процесс пассивной диффузии через липидные бислои происходит относительно медленно, и равновесная концентрация внутри мембраны для большинства соединений чрезвычайно мала, то на временах доступных МД (при полноатомных вычислениях не более десятков наносекунд) наблюдать спонтанную диффузию в МД эксперименте чрезвычайно сложно, и тем более, невозможно набрать статистически достоверные данные о равновесном распределении концентрации молекул. Поэтому, в работе развивался подход к изучению кинетических свойств мембран с использованием полноатомной неравновесной молекулярной динамики.

В рамках данного подхода к молекуле пенетранта прикладывался дополнительный потенциал для форсирования эволюции системы по выбранным степеням свободы, что позволяет за разумные времена численного эксперимента дать количественную оценку параметрам, характеризующим физические механизмы диффузии в микрогетерогенных структурах.

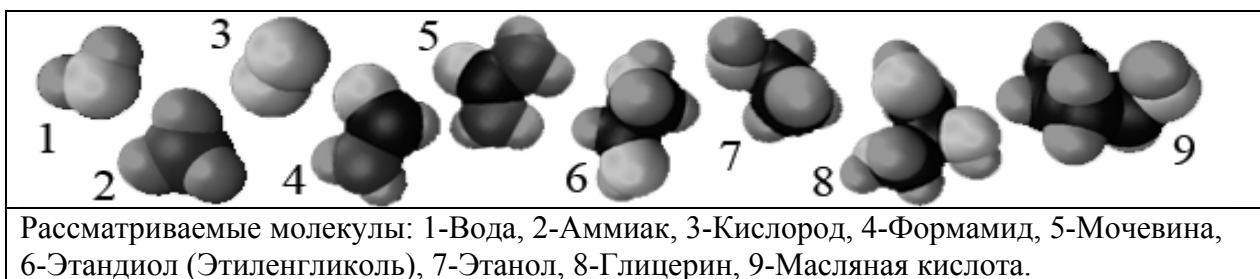


Рис. 6. Рассматриваемые молекулы пенетрантов.

В водную среду помещалась изучаемая молекула, к которой далее прилагалась постоянная сила, направленная по нормали к поверхности мембраны. Прилагались силы, равные 2 и 6 ккал/моль·Å⁻¹ (в последнем случае, проводилось не менее четырех повторных замеров). Сила прикладывалась равномерно ко всем атомам лиганда. Расчет траекторий проводился до первого полного прохода через мембрану, но не более 2 нс.

Под действием внешней силы, молекула проникает в мембрану. При этом смещение молекулы определяется в основном движением под воздействием внешней силы, а вкладом диффузии практически можно пренебречь. Можно оценить усредненный локальный коэффициент трения как отношение величины приложенной силы к средней скорости дрейфа, исходя из формулы: $\gamma = \frac{F_{\text{ext}}}{v}$.

Коэффициент трения, используя формулу Стокса-Эйнштейна, можно пересчитать в терминах эффективных микровязкости среды или коэффициента диффузии: $D = k_b T / \gamma = \frac{k_b T}{6\pi\eta r}$. Следует отметить, что приближение сплошной среды, для молекулярной системы, требует определенных пояснений. В случае липидных бислоев, значение эффективной микровязкости, следует понимать как некую количественную характеристику диссипативных свойств бислоя, выраженную в единицах вязкости.

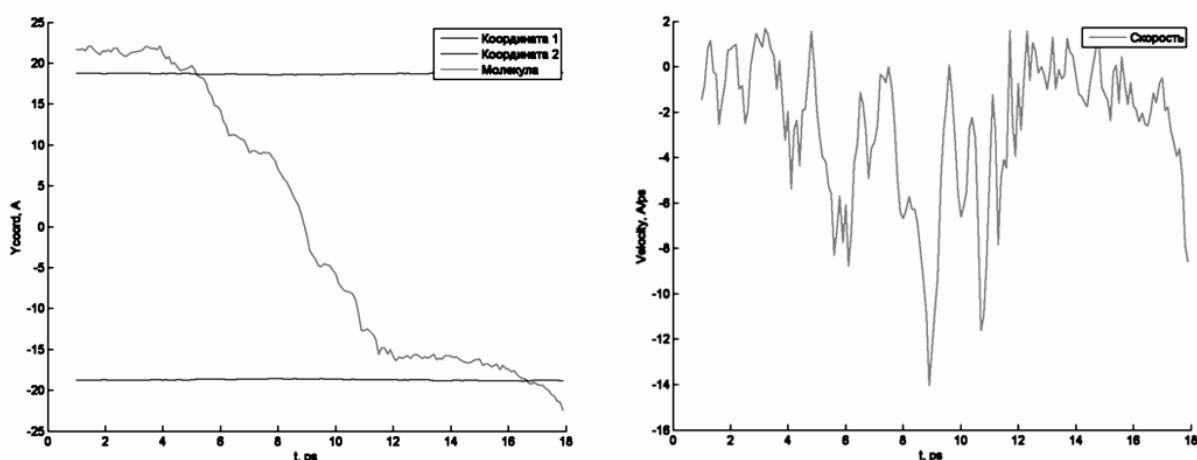


Рис. 7. Кинетика прохождения молекулы аммиака под действием силы 6 ккал/(Å·моль) в направлении нормали к мембране через бислои системы I. (а) – Положение молекулы по оси Y (нормали мембраны). Почти горизонтальными линиями показаны усредненные координаты атомов фосфора фосфолипидов. (б) – Скорость перемещения молекулы.

При использованных значениях силы молекулы проходят через мембрану за времена порядка наносекунд. Отметим, что определяемая эффективная микровязкость уменьшается с увеличением приложенной к лиганду силы, что свидетельствует о неньютоновском характере среды и слабой неравновесности данной системы при скоростях движения порядка $1 - 15 \text{ \AA}/\text{пс}$ (меньше или порядка скорости звука в воде).

Полученные значения эффективной микровязкости в зависимости от типа пробной молекулы и величины приложенной силы приведены на Рис. 8.

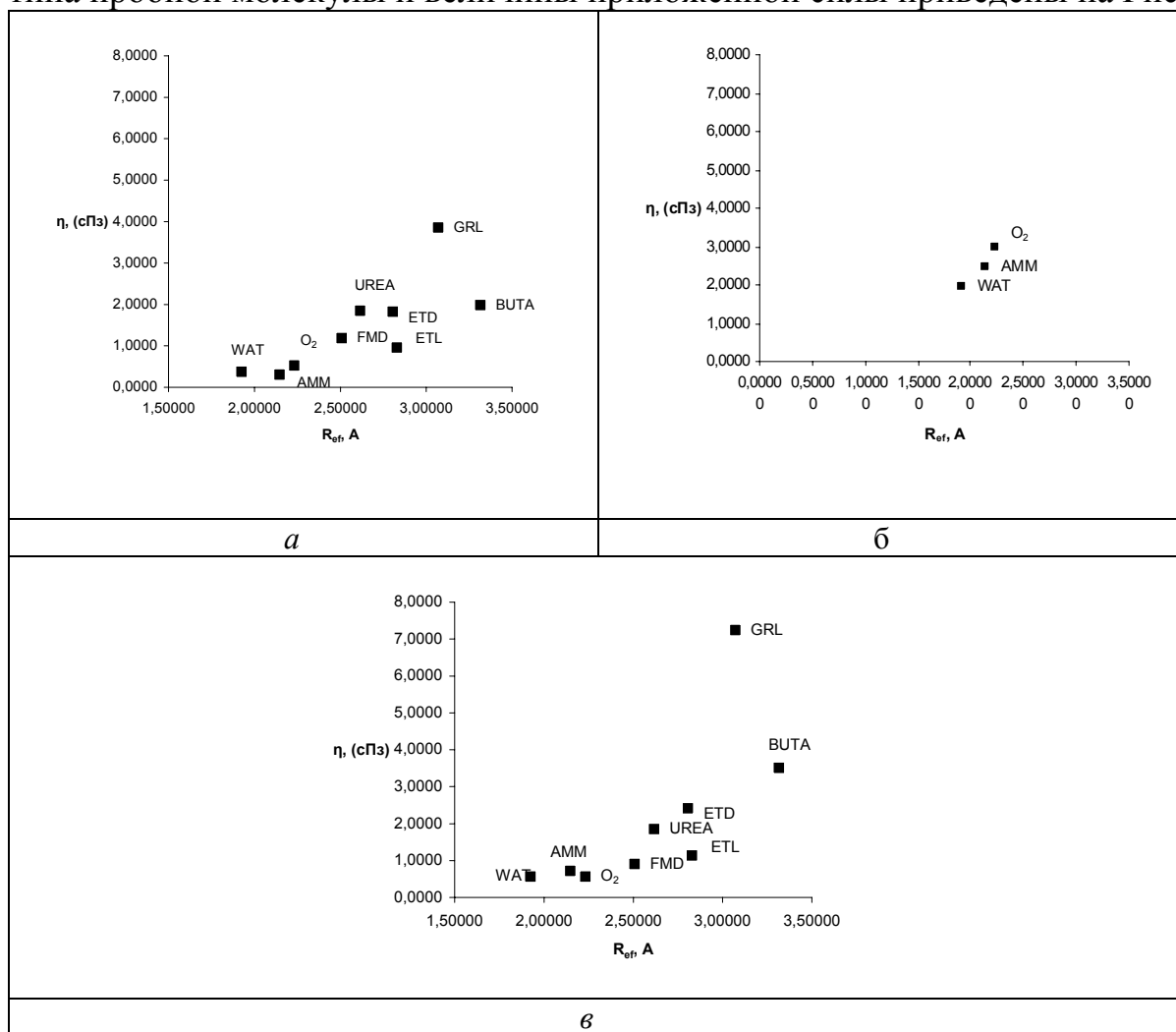


Рис. 8. Зависимость микровязкости от эффективного радиуса R_{ef} пробных молекул *a)* — в системе I, внешняя сила $6 \text{ ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1}$, *б)* — в системе I, внешняя сила $2 \text{ ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1}$, *в)* - В системе III, внешняя сила $6 \text{ ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1}$. Обозначения молекул: WAT — вода, AMM — аммиак, O₂ — молекулярный кислород, FMD — формамид, ETD — этандиол, ETL — этанол, UREA — мочеви́на, GRL — глицерин, BUTA — масляная кислота.

Обращает на себя внимание относительно более высокая эффективная вязкость ПОФХ мембраны (Система III, Рис. 8.-в), по сравнению с мембраной состава ПОФХ/ДПФХ/КЛ. По-видимому, при тех же условиях ПОФХ мембрана находится в квазикристаллическом состоянии. При увеличении содержания ненасыщенных липидов проницаемость возрастает, так как наличие двойных связей способствует уменьшению упорядоченности

бислоя и приводит к разрыхлению полукристаллического состояния мембранной структуры.

Чем выше значение эффективной микровязкости мембраны при данном значении силы, тем меньше вероятность проникновения пенетранта через мембрану. При значениях силы порядка $2 \text{ ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1}$ только очень небольшие молекулы способны проникнуть через мембрану за время порядка наносекунд (Рис. 8.-б). Заметим, что в настоящее время экспериментально известна усредненная величина вязкости поверхностного слоя биомембраны, составляющая от 30 до 190 сПз для различных липидных мембран. Для ПОФХ известна также экспериментальная оценка усредненной вязкости порядка 18 сПз. Экспериментальные данные по микровязкости в направлении нормали практически отсутствуют.

При гидродинамическом режиме движения пенетранта величина микровязкости не должна зависеть ни от размера, ни от химической структуры молекулы. Отклонения, наблюдаемые на Рис. 8., вызваны, по-видимому, специфичностью взаимодействия лиганда с мембраной, складывающейся из нескольких факторов. Во-первых, радиусы частиц и также структурные особенности окружения таковы, что приближение сплошной среды не работает. Во-вторых, величина приложенной силы и, соответственно, скорость движения относительно велики, и условие ламинарного обтекания также не соблюдается. Отметим, что общая закономерность такова: чем больше радиус низкомолекулярного лиганда, тем больше эффективная микровязкость мембраны. Это согласуется и с наблюдаемым здесь эффектом увеличения эффективной микровязкости при уменьшении внешней силы (и, следовательно, замедлении скорости проникновения частицы).

Анизотропную микровязкость в разных областях по отношению к нормали бислоя вычисляли путем измерения средней скорости, с которой молекула проходила каждый участок бислоя в различных направлениях с заданным значением силы (Рис. 9. -а). Используя формулу Стокса-Эйнштейна, вычислялся локальный коэффициент трения, который далее выражался в терминах микровязкости (Рис. 9. -б).

Сравнительное изучение проницаемости мембран для различных молекул показывает, что наибольшие различия для эффективной микровязкости в зависимости от химической природы молекулы-пенетранта наблюдаются в области полярных липидных голов. Гидрофобная центральная часть бислоя оказывается менее вязкой, и менее чувствительной к химической природе молекулы, чем область голов фосфолипидов.

Рассчитанная вязкость в толще воды гораздо менее чувствительна к химической природе молекулы-пенетранта и равна примерно 0.2 – 0.4 сПз, что в 2-3 раза меньше известных экспериментальных значений, но согласуется с оценками вязкости для модели воды ТРЗР.

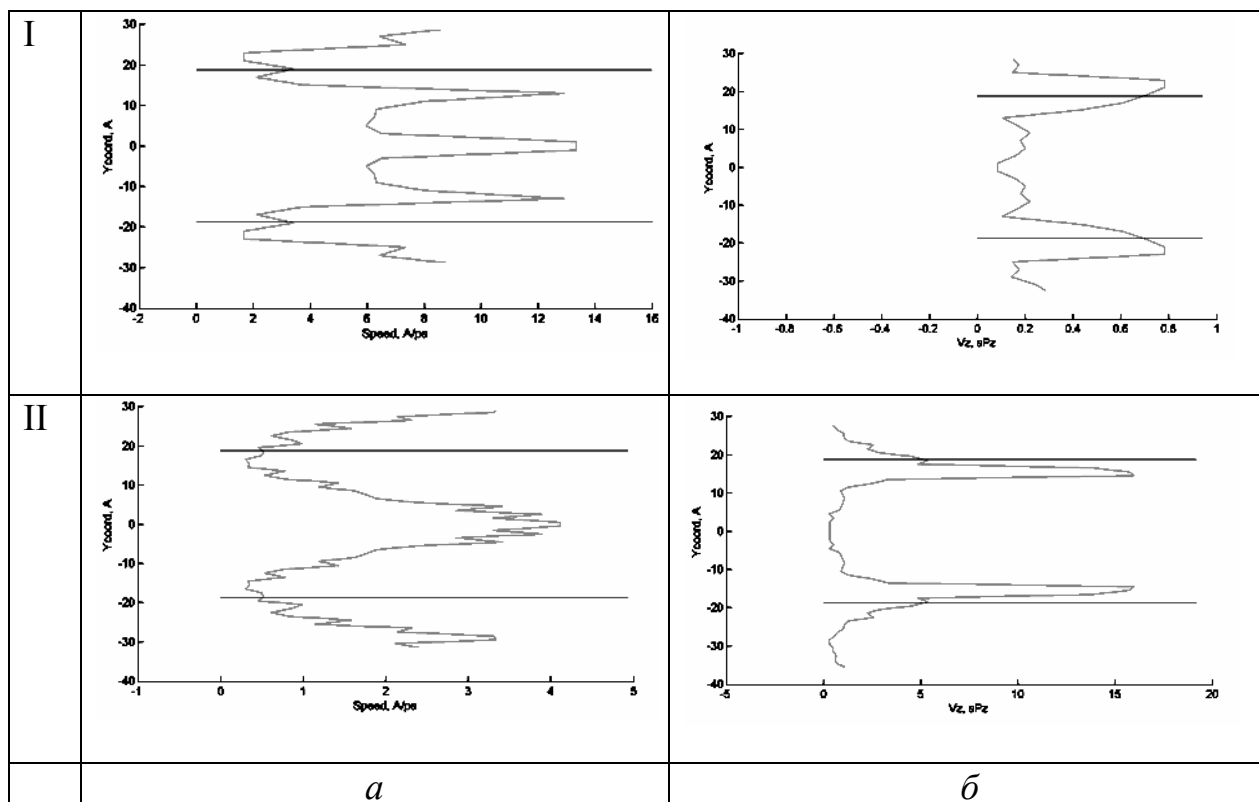


Рис. 9. а) средняя скорость движения молекул аммиака (I) и мочевины (II) в направлении нормали к мембране, в различных частях бислоя исследуемой системы I, под действием внешней силы $6 \text{ ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1}$. Усреднение проводилось по 4 численным экспериментам в случае аммиака, и по 6 экспериментам в случае мочевины. б) вычисленная локальная микровязкость бислоя. Горизонтальными линиями показаны усредненные координаты атомов фосфора фосфолипидов бислоя.

В работе проведено сравнение экспериментальных данных по проницаемости малых молекул через биомембраны с получаемыми в МД эксперименте коэффициентами диффузии (Табл. 4.). Проницаемость мембраны представляет собой произведение коэффициента диффузии на коэффициент распределения вода–мембрана, нормированное на толщину мембраны. Данные, приведенные на Рис. 10. позволяют оценить соответствие вычисленных величин и экспериментальных значений проницаемости. Поскольку вычисление коэффициентов межфазного распределения, особенно с учетом гетерогенности мембраны вдоль нормали, представляет собой отдельную проблему, то коэффициент распределения пенетранта оценивался, исходя из данных для систем вода–гексадекан.

Вычисленный коэффициент диффузии для кислорода ($241,7 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{сек}$ для системы I и $250,3 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{сек}$ для системы III), близок к коэффициенту диффузии для кислорода в воде ($300 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{сек}$). В литературе существуют данные о достаточно высоком значении коэффициента межфазного распределения кислорода в системах вода – мембрана (порядка 2-4, для бислоев димиристоилфосфатидилхолина (*W.K. Subczynski & J.S. Hyde // Biophys. J. 1983. V.41 P.283-286.*) и достаточно высокой проницаемости этого липидного бислоя для кислорода до 210 см/сек (*B.G. Dzиковski et al // Biophys. J.*

2003. V.85 P.1005-1012). Принимая во внимание эти данные, можно говорить о достаточно хорошем соответствии расчетных и экспериментальных данных для кислорода. Однако следует отметить отсутствие в настоящее время единого мнения относительно порядка величины проницаемости липидных бислоев для кислорода, что обусловлено многостадийностью данного процесса и трудностями измерения изменений концентрации кислорода в мембране.

Табл. 4. Вычисленные значения коэффициентов диффузии пенетрантов для систем I и III, величины $D \cdot K / \Delta x$ и известные из литературы значения проницаемостей. Обозначения названий молекул как на Рис. 8.

Молекула	Коэффициент диффузии $\cdot 10^7$ см ² /сек		$K_{hc} \cdot D / \Delta x \cdot 10^3$ (см/сек)		$P_m \cdot 10^3$ (см/сек)
	I	III	I	III	
WAT	323,863	250,272	3,4006	2,6279	* 3,4
FMD	96,532	100,106	0,1907	0,1977	* 0,1
GRL	22,337	11,181	0,0112	0,0056	* 0,0054
ETD	43,698	36,945	0,1857	0,1570	* 0,088
UREA	57,402	55,099	0,0040	0,0039	* 0,004
ETL	87,326	93,616			
AMM	364,494	243,025	200,4714	133,6637	* 130
BUTA	38,092	41,620	82,8499	90,5242	* 95

* - для бислоев яичного фосфатидилхолина (*A. Walter & J. Gutknecht // J. Membrane Biol. 1986. V.90 P.207-217*)

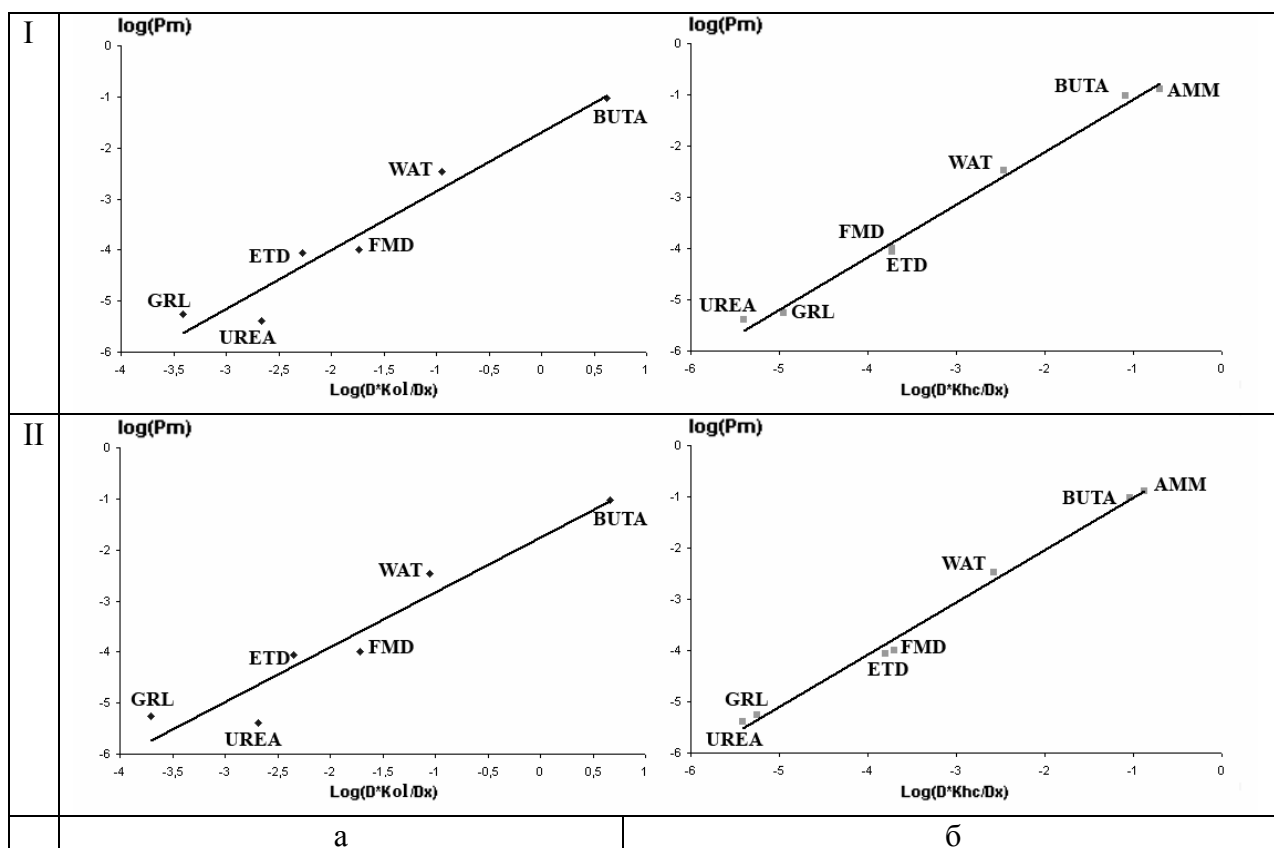


Рис. 10. Зависимость проницаемости P от величины $D \cdot K / \Delta x$, K — коэффициент распределения вода — гидрофобный растворитель, Δx — толщина мембраны ($\sim 40 \text{ \AA}$): I-a) - для оливкового масла для системы I), I-б) - для гексадекана, II-a) - для оливкового масла для системы III, II-б) - для гексадекана. Обозначения названий молекул как на Рис. 8.

В соответствии с имеющимися данными для коэффициента распределения и вычисленными значениями $D \cdot K / \Delta x$ ряд проницаемости в направлении увеличения выглядит следующим образом: глицерин~мочевина, этандиол, формамид, вода, масляная кислота, аммиак, кислород.

В целом, имеется определенное согласие вычисленных и экспериментально измеренных значений проницаемости для рассматриваемых молекул. Наблюдающиеся отклонения могут быть связаны с неточностью сопоставления использованных коэффициентов распределения с соответствующими коэффициентами для биомембраны.

В Приложении 1 рассмотрены возможности применения разработанных в диссертации методов к исследованию молекулярной динамики и конформационной подвижности аналогов гептапептида LDSYQCT — фрагмента альфа-фетопротейна - основного онкофетального белка человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе методами МД для полностью гидратированных бислоев из смесей ПОФХ, ДПФХ и КЛ в рамках единого протокола молекулярного моделирования в полноатомном приближении проведено сравнение основных структурных и кинетических параметров биомембран различного липидного состава. Использование сглаживающих функций и сравнительно больших радиусов обрезания, позволяет компенсировать эффекты от обрезания для невалентных взаимодействий. Использование столкновительного термостата и баростата Берендсена с анизотропным баростатированием позволяет компенсировать как эффекты поверхностного натяжения, так и естественные погрешности параметризации силового поля. Используемая методика приводит систему к локальному равновесию за времена порядка 1нс и практически неизменным в дальнейшем распределениям и профилям изученных параметров.

Использование данного МД-протокола, позволяет изучать полностью гидратированные бислои липидов, и позволяет определять, в частности, такие их параметры как распределение электронной плотности относительно нормали к мембране, радиальные функции распределения атомов в плоскости бислоев, коэффициенты латеральной диффузии липидов, параметры порядка для алкильных цепей липидов, а также проводить сравнительный анализ этих величин.

Полученные таким образом величины для толщины бислоя, распределения атомных групп и электронной плотности относительно нормали к мембране, радиальные функции распределения атомов в плоскости бислоя, параметры порядка для липидных цепей не противоречат

имеющимся данным. Выявлено изменение в сторону понижения средней толщины мембраны, при увеличении в ее составе доли ненасыщенных липидов. Изучение коэффициента латеральной диффузии, позволяет сделать вывод о том, что на коротких временах среднеквадратическое смещение липидов слабо зависит от размеров липида и липидного состава бислоя, что может говорить о механизме диффузии липидов на малых временах, который вероятно заключается в поэтапных смещениях отдельных звеньев. Сравнительное изучение коэффициента латеральной диффузии, указывает на уменьшение подвижности липидов в соответствии с увеличением объема молекулы и добавлением двойной связи, что не противоречит существующим представлениям.

В работе развит метод управляемой МД, для сравнительного изучения вязкостных свойств бислоев для ряда низкомолекулярных соединений. В рамках подхода, изучалась проницаемость двух типовых липидных бислоев для ряда 10 модельных молекул. Показано, что эффективная микровязкость бислоя различна в разных частях, однако наиболее чувствительной к химической природе проникающей молекулы, является область липидных голов. Средняя эффективная микровязкость бислоя зависит как от химической природы молекулы, так и от величины приложенной силы, что говорит о наличии неравновесных эффектов. Сравнительное изучение проницаемости бислоев для различных молекул, позволяет построить ряд проницаемости в целом согласующийся с имеющимися экспериментальными данными.

Сравнительное изучение проницаемости бислоя ПОФХ и бислоя ПОФХ/ДПФХ/КЛ, указывает на большую проницаемость бислоя с большим содержанием ненасыщенных липидов.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Латеральная подвижность липидов слабо, но систематически убывает в ряду ДПФХ–ПОФХ–КЛ по мере увеличения числа двойных связей и увеличением объема молекул липидов. Низкая чувствительность коэффициента латеральной диффузии к вариации структуры липида обусловлена, по-видимому, тем, что механизм диффузии на масштабе времен в несколько наносекунд заключается в поэтапном и мелкомасштабном смещении отдельных звеньев липида.

2. Интенсивность первого максимума радиальной функции распределения ослабевает с увеличением числа входящих в состав бислоя типов липидов, т.е. степень упорядоченности бислоя даже на малых расстояниях уменьшается. Во всех случаях не обнаружено дальнего порядка в упаковке голов липидов.

3. Эффективная микровязкость мембраны зависит от размера молекулы-пенетранта и выше для пенетрантов большего радиуса. Эффективная микровязкость увеличивается также уменьшении скорости

проникновения частицы. Это указывает на не ньютоновский характер среды и наличие неравновесных эффектов при скоростях порядка 1А/пс.

4. Наибольшие различия в сопротивлении проникновению лигандов через мембрану имеют место в области липидных голов. Этот слой играет, по-видимому, роль своеобразного фильтра. Сопротивление внутренней области бислоя мало чувствительно к природе проникающих молекул, но этот слой влияет на коэффициент распределения.

5. Полученный в результате МД экспериментов в полноатомном приближении ряд проницаемостей для молекул – пенетрантов по мере увеличения выглядит следующим образом: глицерин~мочевина, этандиол, формамид, вода, масляная кислота, аммиак, кислород и в целом согласуется с имеющимися экспериментальными данными.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Moldogazieva N.T., K.V. Shaitan, M. Yu. Antonov, A.A. Terentiev. Molecular Dynamics Simulation Study of Interaction of Alpha-fetoprotein – derived Peptides with 17 β -estradiol. Proceeding of II International Moscow conference on computational molecular biology. Moscow, July 18-22, 2005, p.235-237.

2. Moldogazieva N.T., Terentiev Alexander, Antonov M.Yu., Shaitan K.V. Molecular dynamics simulation study of human alpha-fetoprotein-derived peptide LDSYQCT and its analogs. The XXXIV Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM 2006, September 16-20, 2006, Pasadena, California., p.48.

3. Молдогазиева Н.Т., Терентьев А.А., Антонов Ю.М., Шайтан К.В. Изучение взаимодействия эстрогенсвязывающих белков альфа-фетопротейна с 17 β -эстрадиолом с использованием метода молекулярной динамики. Успехи современного естествознания, 2005, Т12, с.86-87.

4. Moldogazieva N.T., Terentiev A.A., Antonov M. Yu., Shaitan K.V. Interaction of alpha-fetoprotein – derived peptides with 17 β -estradiol: a molecular dynamics simulation study. In: Cancer research, tumor markers, clinical oncology. The XXXIII Meeting of the international society for oncodevelopmental biology and medicine, ISOBM. Abstracts. September 24-28, 2005, Rhodes, Greece. p. 108.

5. Антонов М.Ю. - Сравнительное изучение молекулярной динамики биомембран с варьируемым липидным составом. Сборник тезисов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2006”. М.: МГУ, 2006, Секция Биологии, с.14-15

6. Антонов М.Ю. – Изучение проницаемости биомембран методом управляемой молекулярной динамики. Сборник тезисов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2007”. М.: МГУ, 2007г, Секция «Биоинженерия и биоинформатика» подсекция «Молекулярное моделирование», с. 45.

7. Антонов М.Ю. – Изучение физико-химических биомембран методом управляемой молекулярной динамики. Тезисы докладов второго студенческого симпозиума по биоинженерии, М.:МГУ, 2007. с. 4-5.

8. Молдогазиева Н.Т., Терентьев А.А., Казимирский А.Н., Антонов М. Ю., Шайтан К.В. Конформационная динамика аналогов гептапептида LDSYQCT – фрагмента альфа-фетопротейна человека. Биохимия, 2007, 72(5), с. 655-667.

9. Николаев И.Н., Терешкина К.Б., Левцова О.В., Антонов М.Ю., Акимов М.П., Шайтан К.В. Сравнительное изучение динамики конформационных степеней свободы в

серии природных дипептидов. Вестник якутского государственного университета, 2007, Т4, N 2, с. 37-44.

10. Молдогазиева Н.Т., Шайтан К.В., Терешкина К. Б. Антонов М. Ю., Терентьев А.А. Молекулярная динамика фрагмента альфа-фетопротеина человека LDSYQCT и его модификаций. Влияние диэлектрической проницаемости среды. Биофизика, 2007, Т52, вып. 4, с. 611-624.

11. Антонов М.Ю. Компьютерный скрининг взаимодействия нейротоксина PnIA и его мутантных форм с никотиновым ацетилхолиновым рецептором. Тезисы докладов биотехнологической выставки-ярмарки РосБиоТех-2007, М:МГУ, 2007, с. 10-11.

12. К.В. Шайтан, М.Ю. Антонов, Е.В. Турлей, О.В. Левцова, К.Б. Терешкина, И.Н. Николаев, М.П. Кирпичников. Сравнительное изучение молекулярной динамики, диффузии и проницаемости по отношению к лигандам для биомембран с различным липидным составом. Биологические мембраны, 2008, 25(1), с. 75-83.

13. Антонов М.Ю., Балабаев Н.К., Шайтан К.В. PUMA-B. Свидетельство об официальной регистрации программ для ЭВМ № 2006613516

14. Антонов М.Ю., Балабаев Н.К., Шайтан К.В. PUMA-GUI. Свидетельство об официальной регистрации программ для ЭВМ № 2006613517