

---

# МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

К.В. Шайтан, М.Ю. Антонов, А.К. Шайтан,  
В.Н. Новоселецкий, М.Е. Боздаганян, М.А. Касимова

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова*

mikhail.antonov@mail.bio.msu.ru

Поступила 25.08.2011

Обсуждается современное состояние исследований в области компьютерного моделирования и изучения структурных и динамических свойств систем, имитирующих биологические, с использованием метода молекулярной динамики

УДК 539.2; 577.3

## 1. Введение

Применение вычислительных методов в современной биологии занимает исключительно важное место и широко используется при решении задач и проведении исследований в самых различных областях биоинженерии и биотехнологии [1, 2, 3, 4]. Одним из наиболее мощных подходов, используемых в молекулярном моделировании, является метод молекулярной динамики, эффективно применяемый при изучении свойств систем, имитирующих биологические. Метод МД обладает высоким пространственно-временным разрешением и позволяет на атомарном масштабе изучать структурные и физико-химические свойства биологических объектов, а также моделировать происходящие в них сложные динамические процессы. В круг рассматриваемых объектов попадают важнейшие для биологии молекулярные системы – мембранные системы, ионные каналы, белки, пептиды, нуклеотиды и другие [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11].

Первые упоминания о методе молекулярной динамики относятся к 1950-м годам, когда Alder и Wainwright при помощи метода компьютерного моделирования, изучали поведение простейшей модельной жидкости, состоящей из твердых сфер с упругими соударениями [12]. Впоследствии, в 1964 году, Rahman улучшил модель, включив потенциал невалентных взаимодействий Леннарда-Джонса. При этом полученные результаты допускали сравнение с экспериментальными данными [13]. В 1977 году было описано в литературе первое исследование динамики сравнительно большой белковой молекулы в вакууме [14]. В 1977 году было описано в литературе первое исследование динамики сравнительно большой белковой молекулы в вакууме [14]. В дальнейшем, с развитием компьютерной техники, становилось возможным исследовать системы больших размеров, усложнялись используемые физические модели. Появились силовые поля общего назначения для воды, белков, ДНК и стало доступным соответствующее программное обеспечение для компьютерного моделирования (AMBER [15], CHARMM [16], ENCAD [17], GROMOS [18], NAMD [19]).

Ранние работы в этой области исследовали небольшие и сильно упрощенные системы, состоящие из нескольких сотен частиц, использовались достаточно простые формы потенциалов взаимодействия а длины траекторий не превышали нескольких пикосекунд. Однако прогресс в компьютерных технологиях в течение последнего времени и возрастание эффективности применяемых методов МД-моделирования оказались столь стремительными, что породили определенные надежды при решении задач, которые казались ранее неразрешимыми. В качестве примера можно привести самый быстрый в мире суперкомпьютере Tianhe-1A, использующий в своей архитектуре графические процессоры. Исследователи из Института Технологии Производства при Китайской Академии Наук (CAS-IPE) провели смоделирование поведения 110 миллиардов атомов кремния, в кристаллическом состоянии, с вычислительной скоростью в 1.87 петафлопс. Предыдущий рекорд в подобных расчетах составил 49 миллиардов атомов при производительности в 369 терафлопс.

В основе метода МД лежит представление о многоатомной молекулярной системе, в которой атомы представляются взаимодействующими материальными точками и поведение каждого атома описывается уравнениями классической механики. Несмотря на существенные ограничения, такое представление может достаточно хорошо описывать большинство событий происходящих на молекулярном уровне, когда квантовые эффекты менее существенны, чем электростатические взаимодействия.

Рассмотрим, например, фрагмент пептидной цепи (рисунок 1). Для построения пептидной цепи имеется 20 типов различных «кирпичиков» – природных аминокислотных остатков. Полипептиды, как известно, составляют основу белков, выполняющих важнейшие биохимические функции. Эти молекулы имеют набор механических степеней свободы, которые связаны с флуктуациями около положений равновесия длин валентных связей, величин валентных углов и с поворотами вокруг одинарных химических связей. С этими поворотами связаны конформационные степени свободы, которые ответственны за многие функции белков и пептидов [20]. Мы не будем в этой статье рассматривать собственно акт химической реакции. В данный момент нам интересны движения в макромолекуле, которые подготавливают систему к реакции, обеспечивают изменение структуры после акта химической реакции (конформационная релаксация), обеспечивают влияние предыдущей реакции на последующие [20] процессы. Собственно акт химической реакции описывается в терминах электронно-колебательных и электронно-конформационных взаимодействий [20], что требует использования аппарата квантовой механики. Движение системы между химическими актами вполне хорошо может быть описано уравнениями классической механики при температурах выше 10К. Исключение составляют атомы водорода и протон, для которых существенны

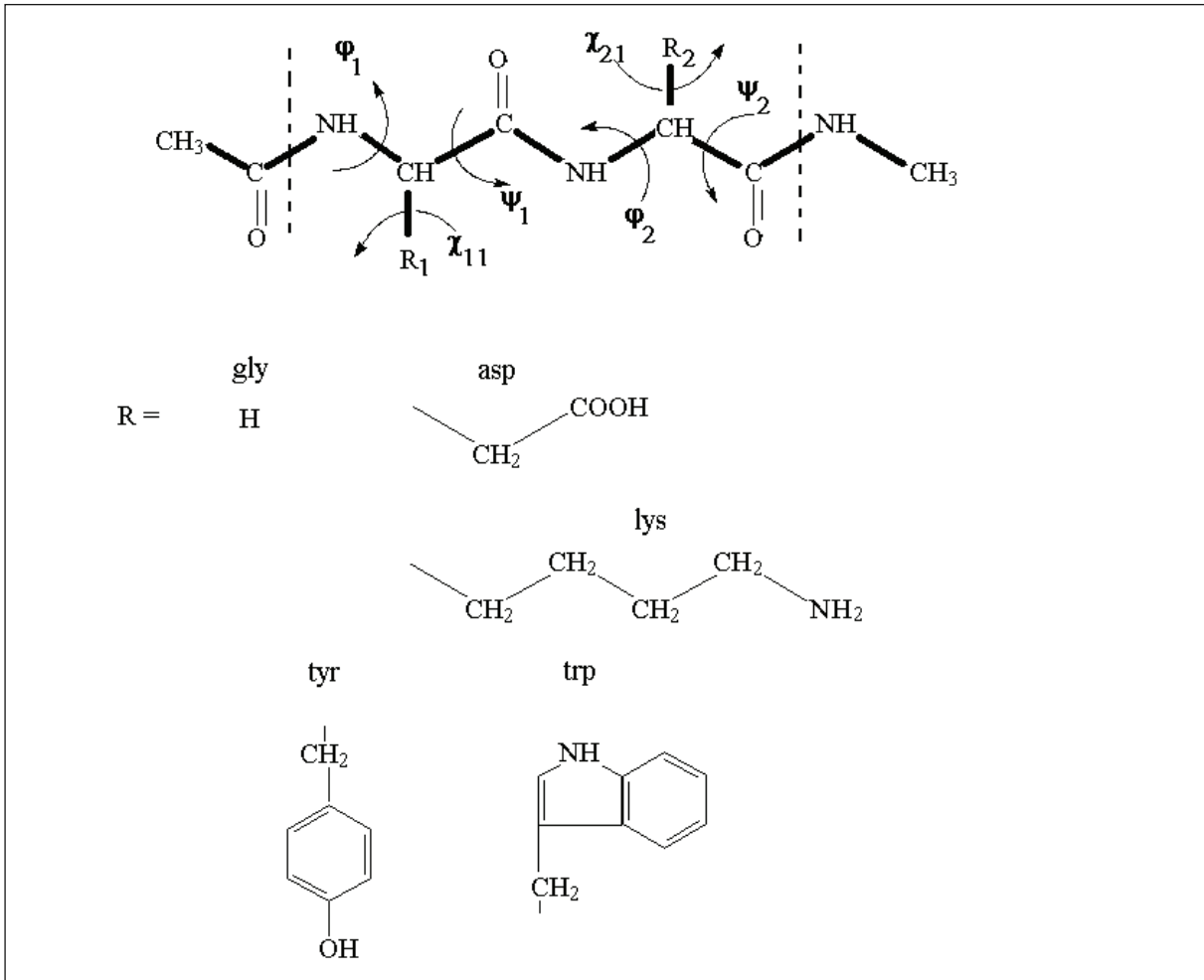


Рис. 1. 1 – структура фрагмента пептидной цепи и обозначения двугранных (торсионных) углов. При моделировании динамики пептидов для устранения концевых эффектов обычно с N-конца присоединяют ацетил, с C-конца – метиламин (отделены от основной цепи пунктирами). 2 – примеры боковых радикалов в природных аминокислотах: gly – глицин, asp – аспарагиновая кислота, lys – лизин, tyr – тирозин, trp – триптофан.

квантовые поправки даже при 1000К. Эти специальные проблемы мы сейчас также не обсуждаем и рассматриваем чисто классическую задачу.

В классической механике состояние системы (наиболее полная возможная информация о системе) из  $N$  частиц (атомов) в момент времени  $t$  однозначно определяется заданием набора векторов координат и скоростей частиц. Обозначим кратко эти наборы  $x = \{x_i(t)\}$  и  $\{v_i(t)\}$ , которые состоят из  $3N$  чисел (каждый вектор имеет 3 компоненты). Основная задача механики состоит в том, чтобы найти состояние системы в произвольный момент времени  $t$ , если известно состояние системы в начальный момент времени (при  $t=0$ ). В классической механике эта задача решается путем вычисления траектории движения  $x(t)$ . Траектория определяется при решении уравнений движения. В классической механике это хорошо известные уравнения Ньютона. В нашем случае мы должны написать систему  $3N$  уравнений:

$$m_i \frac{d^2 x_i(t)}{dt^2} = F_i(x), \quad i = 1, 2, \dots, N, \quad (1)$$

$m_i$  – масса атома,  $F_i$  – соответствующая проекция суммарной силы, действующей на атом со стороны остальных частиц:

$$F_i(x) = -\frac{\partial U(x)}{\partial x_i} \quad (2)$$

$U(x)$  – потенциальная энергия, зависящая от взаимного расположения всех атомов.

В методе молекулярной динамики принципиальный вопрос состоит в способе задания  $U(x)$ . Мы к этому вернемся позднее. Второй принципиальный вопрос состоит в способе решения системы уравнений движения. Даже для небольшого белка число уравнений составляет порядка 10000. Основа алгоритма состоит в следующем. Задав координаты и скорости всех частиц в начальный момент времени, вычисляют на каждом последующем шаге все силы и новые координаты и скорости частиц. Расчеты проводят либо при постоянной энергии системы или, чаще, при постоянной температуре. Мгновенная температура определяется как средняя кинетическая энергия, приходящаяся на одну степень свободы системы:

$$T(t) = \frac{1}{3Nk_B} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2, \quad (3)$$

$k_B$  – постоянная Больцмана. Температура получается усреднением ее мгновенных значений  $T(t)$  по некоторому интервалу времени.

Потенциальная энергия молекулы целиком имеет электромагнитную природу и обычно задается в виде суммы вкладов:

$$U(x) = U_b + U_v + U_\phi + U_\omega + U_{LJ} + U_{el} + U_{hb} \quad (4)$$

где слагаемые отвечают следующим типам взаимодействий:  $U_b$  – химическим связям;  $U_v$  – валентным углам;  $U_\phi$  – торсионным углам;  $U_\omega$  – плоским группам;  $U_{LJ}$  – ван-дер-ваальсовым контактам;  $U_{el}$  – электростатике;  $U_{hb}$  – водородным связям.

Эти вклады имеют различный функциональный вид. Потенциал для валентных межатомных связей имеет вид:

$$U_b = \frac{1}{2} \sum_b K_b (r - b_0)^2, \quad (5)$$

где суммирование проводится по всем химическим связям,  $b_0$  – обозначение для равновесных валентных длин,  $r$  – текущие длины связей,  $K_b$  – соответствующие силовые константы.

Потенциал валентных углов задается выражением:

$$U_g = \frac{1}{2} \sum_g K_g (\vartheta - \vartheta_0)^2, \quad (6)$$

где  $\vartheta_0$  – равновесные значения углов,  $\vartheta$  – их текущие значения,  $K_g$  – силовые константы. Энергия торсионных взаимодействий и потенциалов, отвечающих плоским группам, записываются в одинаковом виде:

$$U_\Phi = \sum_\Phi K_\Phi [\cos(n\Phi - \delta) + 1], \quad (7)$$

где  $n$  – кратность торсионного барьера,  $\delta$  – сдвиг фазы, константы  $K_\Phi$  определяют высоты потенциальных барьеров двугранных углов  $\Phi$ .

Ван-дер-ваальсовы взаимодействия атомов, разделенных тремя и более валентными связями, описываются потенциалами Леннарда-Джонса:

$$U_{LJ} = \sum_{i,j} \left[ \frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{B}{r_{ij}^6} \right] \quad (8)$$

Параметры потенциала  $A$  и  $B$  зависят от типов атомов  $i$  и  $j$ , участвующих во взаимодействии;  $r_{ij}$  – расстояние между этими атомами.

Электростатические взаимодействия задаются кулоновским потенциалом

$$U_{el} = \sum \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}}, \quad (9)$$

где  $q_i, q_j$  – парциальные заряды на атомах,  $\varepsilon$  – диэлектрическая проницаемость среды.

Водородные связи возникают и исчезают в процессе движения атомов между теми из них, которые имеют соответствующий статус. Функциональный вид потенциала водородной связи похож на потенциал ван-дер-ваальсовых взаимодействий, но с более короткодействующими силами притяжения:

$$U_{hb} = \sum_{i,j} \left[ \frac{A'}{r_{ij}^{12}} - \frac{B'}{r_{ij}^{10}} \right] \quad (10)$$

Отметим, что система потенциалов (4)-(10) – весьма приближенный способ задания потенциальной энергии. Его недостатки состоят в том, что энергия взаимодействия представляется в виде суммы парных сферически симметричных взаимодействий. И то и другое, вообще говоря, неверно, но с этим приходится пока мириться.

## 2. Моделирование мембранных структур.

Самая первая модель мембраны («жидко-мозаичная») была предложена в 1972 году [21]. Согласно этой модели, мембрана представляет собой двойной жидкий слой липидов, в котором «плавают» белки. Со временем стало ясно, что мембрана играет роль не только растворителя для белков. Современные методы исследования, такие как ядерный магнитный резонанс (ЯМР), инфракрасная (ИК) и флуоресцентная микроскопии, рентгеноструктурный анализ и нейтронная дифракция, позволяют достаточно точно и детально описать структуру и основные физико-химические свойства мембран.

С 70-х годов предпринимались попытки изучить строение липидного бислоя на атомарном уровне, однако из-за сложности объекта сделать это трудно, а иногда и невозможно. Мощным методом в изучении структуры мембран явилась молекулярная динамика: в 1988 году Egberts[22] впервые представил методику моделирования мембраны. С тех пор благодаря бурному развитию компьютерной техники разработаны новые подходы к изучению биомембран.

### 2.1. Виды биологических мембран, их состав

Биологические мембраны построены в основном из белков, липидов и углеводов. Белки и липиды составляют основную часть сухой массы мембран. Доля углеводов обычно не превышает 10-15%, причем они связаны либо с молекулами белка (гликопротеины), либо с молекулами липидов (гликолипиды). В мембранах различного происхождения содержание липидов колеблется от 25 до 75% по массе по отношению к белку (Таблица 1) [23].

Липидный состав биологических мембран весьма различен и зависит от выполняемых функций, изменения в нем ведут к неправильному функционированию [24, 25]. Например, изменение эффективной молекулярной формы липида может привести к изменению функции белков. Экспериментально доказано, что мембрана состоит из так называемых рафтов, которые представляют собой функциональные «островки» из липидов определенного состава с белками [26]. Кроме того, рафты одной мембраны могут находиться в разных фазах.

Состав мембран разных организмов варьирует. В данной работе рассматриваются два типа мембран: про- и эукариот (Таблица 2).

В качестве модельной мембраны эукариотической клетки в молекулярном моделировании часто используют мембрану из фосфатидилхолинов. Фосфатидилхолины (рисунки 1) относятся к группе глицерофосфолипидов (одна из гидроксильных групп гли-

Таблица 1. Липидный состав клеток млекопитающих, % от массы всех липидов

Липиды	Плазматические мембраны	Митохондрии	Лизосомы	Ядра	ЭПР	Аппарат Гольджи
Фосфатидилхолин	18,5	37,5	23	44	48	24,5
Сфингомиелин	12	0	23	3	5	6,5
Фосфатидилэтаноламин	11,5	28,5	12,5	16,5	19	9
Фосфатидилсерин	7	0	6	3,5	4	2,5
Фосфатидилинозитол	3	2,5	6	6	7,5	5
Лизофосфатидилхолин	2,5	0	0	1	1,5	3
Дифосфатидилглицерин	0	14	5	1	0	0
Другие фосфолипиды	2,5					
Холестерин	19,5		14	10	5,5	7,5
Эфиры холестерина	2,5	2,5	8	1	1	4,5
Свободные жирные кислоты	6			9	3,5	18
Другие липиды	15	15	2,5	5,5	5	16

Таблица 2. Липидный состав мембран про- и эукариот. Используемые сокращения: ФХ – фосфатидилхолин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ФИ – фосфатидилинозитол, ФГ – фосфатидилглицерол, КЛ – кардиолипин

Мембраны	Основные липиды
Саркоплазматический ретикулум (кролик)	ФХ 66%, ФЭ 12,6%, ФИ 8,1%
<i>E. coli</i> (внутренняя мембрана)	ФЭ 74%, ФГ 19%, КЛ 3%

цера связана с полярной группировкой, содержащей фосфат, а две другие – с гидрофобными остатками).

Для моделирования прокариотической мембраны пользуются моделью, состоящей из смеси липидов: фосфатидилэтаноламина и фосфатидилглицерола (также относятся к группе глицерофосфолипидов) в соотношении 3:1 соответственно. Фосфатидилэтаноламин – нередко основной липид прокариотических мембран, фосфатидилглицерол несет заряд – 1, поэтому модельные мембраны прокариотов всегда заряжены отрицательно.

## 2.2. Физические свойства

На свойства мембран оказывает сильное влияние температурозависимый переход липидов кристалл-жидкость. При низких температурах фосфолипидный бислой находится в гель-фазе ( $L_{\beta}$ ), характеризующейся высокой степенью упорядоченности, т.е. цепи ориентируются практически параллельно друг другу. Следствием этого является уменьшение площади, приходящейся на одну молекулу липида. В случае фосфолипидов происходит также наклон цепей по отношению к нормали мембраны. При более высоких температурах мембрана переходит в жидкокристаллическую фазу ( $L_{\alpha}$ ).  $L_{\alpha}$ -фаза характеризуется меньшим значением коэффициента упорядоченности и большим значением площади, приходящейся на один липид. Фазовый переход для ДПФХ наблюдается при 41,5 °С. При физиологических температурах большинство липидов находятся в  $L_{\alpha}$ -фазе и небольшая в  $L_{\beta}$ .

Длина фосфолипидной молекулы в жидкой закристаллизованной мембране порядка 20 Å. Длина зависит от состава хвоста и головки, и самое главное, от пространственной конформации молекулы. По данным рентгеноструктурного анализа для молекулы ДПФХ площадь, приходящаяся на липид составляет,  $62,9 \pm 1,3 \text{ \AA}^2$  ( $T=323 \text{ K}$ ); количество молекул воды, приходящаяся на липид при полной гидратации мембраны 29,1, ламеллярное пространство составляет 67,2 Å [27]. Коэффициент латеральной диффузии со-

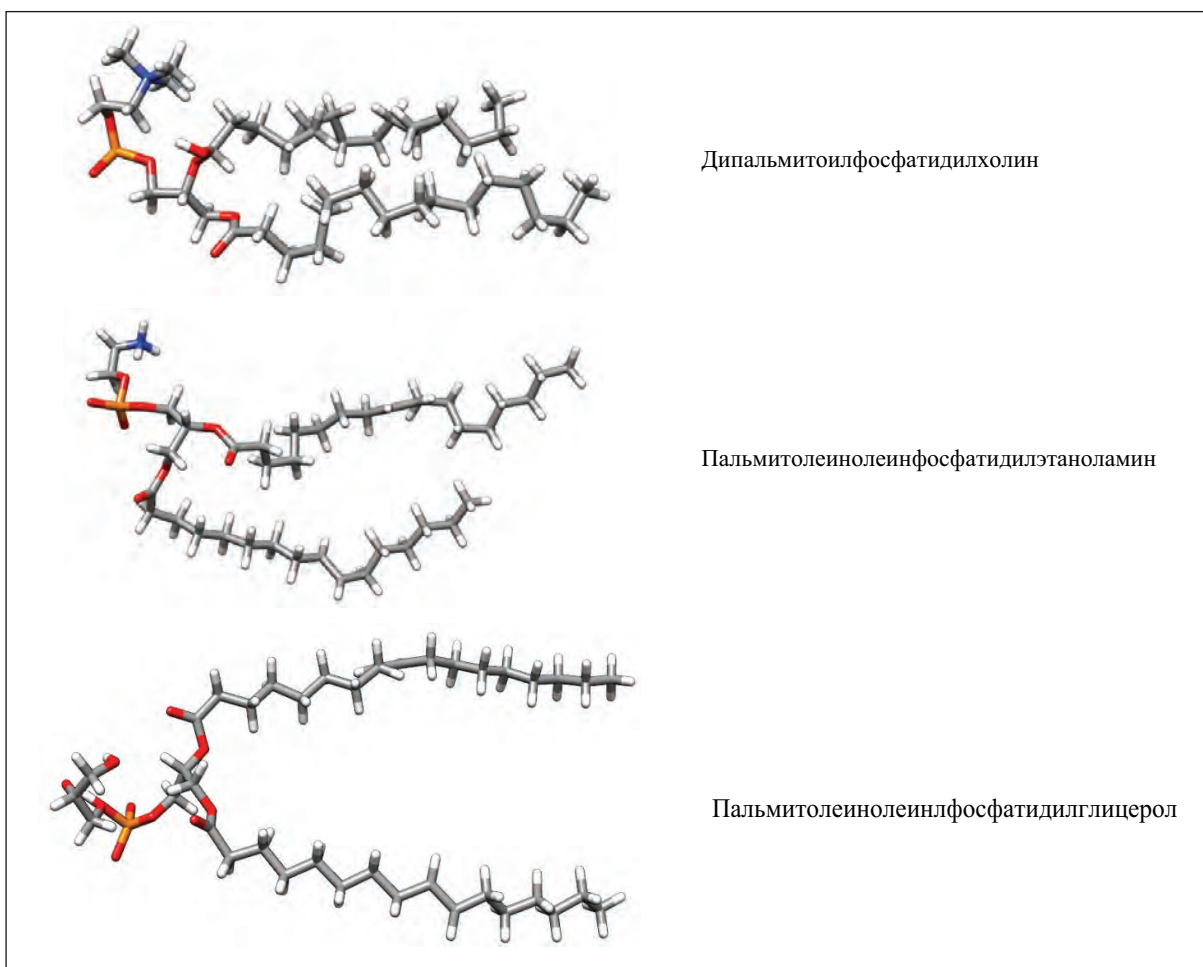


Рис. 2. Пространственное строение мембранных липидов.

ставляет  $10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$ . Параметр порядка может быть получен экспериментально из данных ЯМР или ИК-спектроскопии и определен как:  $S_{ij} = \langle 1,5 \cos \theta_i \cos \theta_j - 0,5 \delta_{ij} \rangle$ , где  $\theta_i$  - угол между С-Н-связью при  $i$ -том атоме в алкильной цепи и нормалью к мембране, угловые скобки означают усреднение по времени. Для ДПФХ параметр порядка может быть вычислен как  $-S_{CD} = \frac{2}{3} S_{xx} + \frac{1}{3} S_{yy}$ , и модуль  $|S_{CD}|$  для атомов с С4 по С8 равен 0,217 согласно экспериментальным данным [28].

Самые быстрые колебания (связей, валентных и торсионных углов) в молекуле липида совершаются атомами водорода (время порядка 0,5 фс). Колебания остальных атомов совершаются при временах порядка нескольких пикосекунд; переход транс-гош конформации осуществляется на временах порядка десятков пикосекунд, причем чем ближе к головке липида, тем больше времени требуется для такого конформационного перехода благодаря более плотной упаковке цепей (рисунок 3).

Движение головки относительно поверхности мембраны осуществляется быстро (десятки пикосекунд), в то время как существенные изменения в положении головки происходят за несколько наносекунд. Поворот липида вокруг своей оси осуществляется за время порядка нескольких наносекунд, диффузия двух липидов в латеральной плоскости мембраны осуществляется за время порядка нескольких десятков наносекунд, переходы типа флип-флоп могут занимать время порядка минут или даже часов.



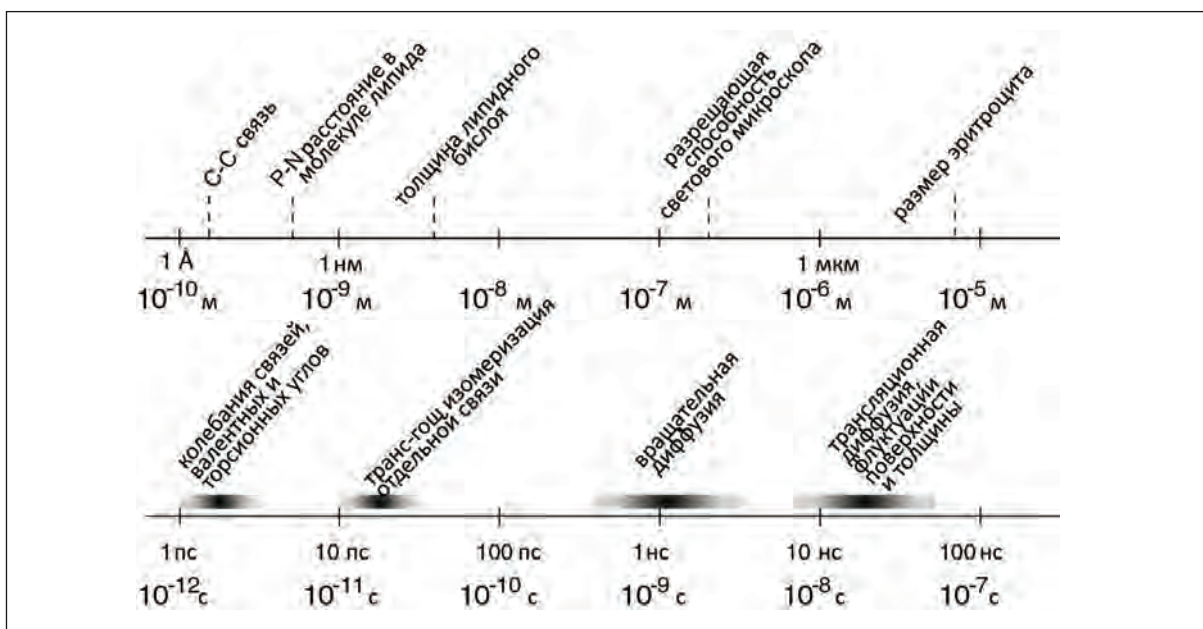


Рис. 3. Соотношение характерных масштабов времен и расстояний при исследованиях биомембран

### 2.3. Молекулярная динамика биомембран

Молекулярное моделирование является мощным инструментом в изучении и визуализации динамики липидов. Однако в методе МД существуют ограничения, связанные с размерами системы, временами расчета и точностью подбираемых параметров. Обычно проводится динамика нескольких сотен липидов в течение десятков наносекунд. Один из наиболее часто используемых методов для увеличения скорости расчета – это исключение дальнедействующих электростатических взаимодействий. Часто используются метод обрезания (cut-off), который, однако вносит значительные изменения в свойства системы, и поэтому в настоящее время все чаще используются методы PME (particle mesh Ewald) и RF (reaction field). Метод PME основывается на интерполяции обратной суммы Эвальда. Центральная ячейка расчета копируется периодическими граничными условиями, и все электростатические взаимодействия в такой «размноженной» системе суммируются. Метод суммирования по Эвальду подходит для расчета дальнедействующих электростатических сил в периодических граничных условиях. В данной работе использовались методы cut-off для вакуума и PME для систем с водой.

При моделировании мембраны важно, чтобы соблюдались основные ее физические свойства, а для этого необходимо верно подобрать не только силовое поле но и параметры расчета. В работе Anezo с соавторами [29] проводятся методологические исследования моделирования липидных бислоев. Основные выводы из этой работы таковы:

1. Для расчета площади, приходящейся на одну головку необходимо провести динамику в течение 5-10 нс из-за высоких флуктуаций в значениях.
2. Значение площади, приходящейся на головку липида довольно чувствительно к параметрам расчета, особенно к учету дальнедействующих электростатических взаимодействий. Для ДПФХ считается приемлемым значения  $62-66 \text{ \AA}^2$ .
3. Тип баростата не влияет на равновесные свойства мембраны. Однако предпочтительнее использовать баростат Паринелло-Рамана для теоретических расчетов свойств мембраны, нежели баростат Берендсена. С другой стороны, баростат Берендсена лучше погашает осцилляции в мембране, проявляющиеся при релаксации бислоя.

### 3. Моделирование ионных каналов.

Барьерно-транспортная функция клеточных мембран обеспечивает регулируемый пассивный и активный обмен веществ между клеткой и внеклеточной средой. Проницаемость мембран для различных соединений зависит от ряда параметров, таких как размеры атомов и молекул, электростатические и химические свойства. Также через мембраны клеток происходит доставка питательных веществ в клетку, удаление продуктов обмена, секреция различных веществ, образование и поддержание трансмембранного потенциала, поддержание заданного  $\Phi$  и ионной силы во внутриклеточном растворе.

В случае если частица не может проникнуть через барьер липидов посредством диффузии, в клетке предусмотрены механизмы активного и пассивного транспорта, осуществляющие перенос массы как в направлении градиента концентрации (пассивный транспорт), так и в противоположном (активный транспорт). В случае, если перенос протекает против градиента концентрации, транспорт производится с затратой энергии. Транспорт осуществляется ионными каналами, представляющими из себя интегральные белковые структуры, встроенные в мембрану. Трансмембранный транспорт ионов через каналы лежит в основе генерации электрической активности в нервных и мышечных клетках и передаче возбуждения в нервной системе, контроля возбудимости сердечной мышцы, внутриклеточной передачи сигнала, секреции многих гормонов, клеточной пролиферации и регуляции клеточного объема.

Одним из несомненных достоинств метода молекулярной динамики является возможность изучения динамических процессов, в частности это касается процессов переноса ионов через ионные каналы клеток.

Из потенциал-зависимых ионных каналов одним из наиболее изученных является бактериальный калиевый канал KcsA, который является упрощенной моделью потенциал-зависимых калиевых каналов возбудимых клеток эукариот. Четвертичная структура закрытого состояния KcsA была разрешена группой исследователей под руководством профессора MacKinnon в 1998 году [30]. KcsA состоит из четырех идентичных субъединиц, т.е. представляет собой гомотетрамер. Каждая субъединица состоит из двух ТМ спиралей (M1 и M2), нисходящей поровой спирали (P-спираль) и восходящей петли (F-участок), соответствующей селективному фильтру канала (рисунок 4А).

Радиус поры в области внутриклеточных ворот для структуры KcsA, полученной профессором MacKinnon,  $2 \text{ \AA}$ , не значительно превышает радиус иона калия,  $1.33 \text{ \AA}$ , и меньше радиуса гидратированного иона калия на  $2.3 \text{ \AA}$ . В связи с этим, на уровне главных ворот иону не выгодно снимать гидратную оболочку, поскольку энергию дегидратации нечем компенсировать. 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 [31].

На рисунке 5 представлены рассчитанные профили радиуса поры, построенные программой HOLE. На входе программа HOLE запрашивает координатный файл `pdb`, считывает координаты атомов, их имена и имена остатков, к которым они принадлежат. На основе полученной информации каждому атому сопоставляется значение ван-дер-ваальсового радиуса из файла силового поля. Далее для различных координат внутри канала рассчитывается максимальный радиус сферы  $R(p)$ , которая центрирована в точке  $p$  на оси канала и не пересекается со сферами, соответствующими атомам кана-

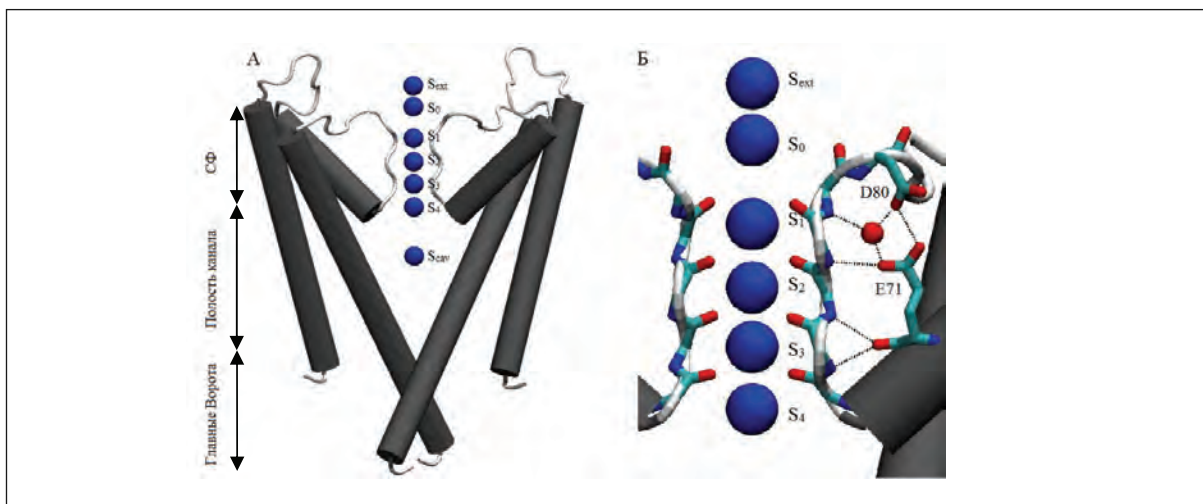


Рис. 4. Калиевый канал KcsA. Структура.

А: Вид сбоку. В целях наглядности на рисунке изображены только две субъединицы из четырех. Серым цветом обозначены  $\alpha$ -спирали, белым – петли. Синим цветом обозначены ионы калия. Sext, So, S1, S2, S3, S4 – 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.

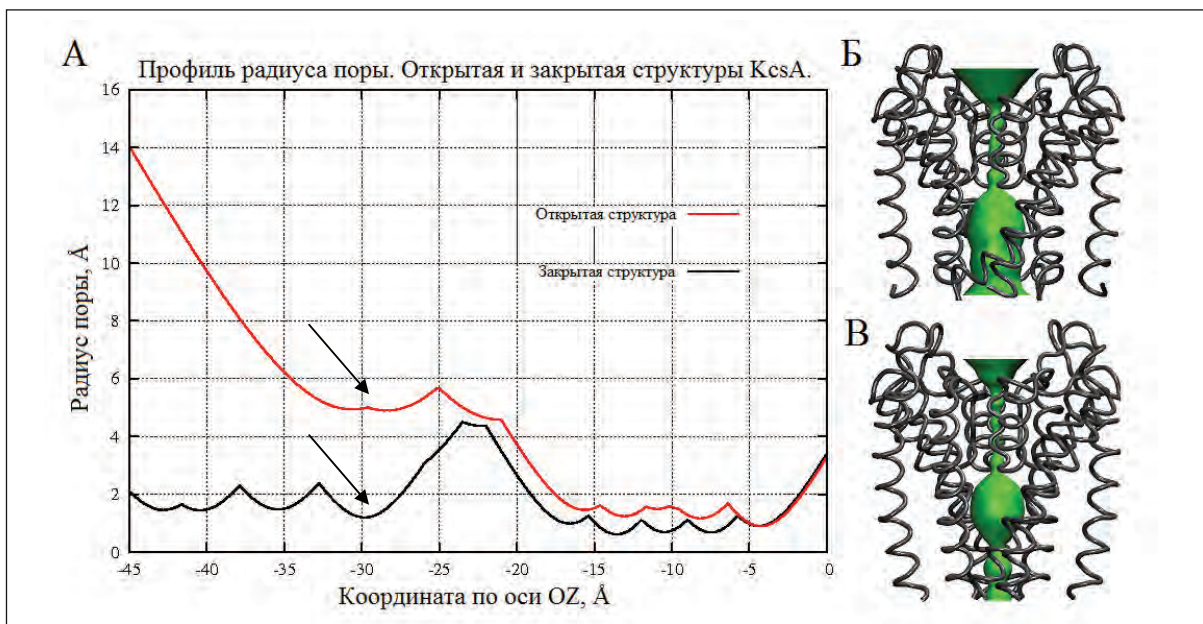


Рис. 5. Профиль радиуса поры. Открытая и закрытая структура KcsA. А: Профиль радиуса поры, построенный с помощью программы HOLE для открытой и закрытой структур KcsA. Кривая красного цвета соответствует открытой структуре (структура с pdb кодом 3fb7), черного – закрытой. Стрелкой обозначена область лейцинового кольца (главные ворота канала). Б: Открытая структура. В: закрытая структура.

ла. Зависимость этого радиуса от координаты внутри канала и представляет собой результат работы программы.

На рисунке 5 представлены данные для открытой и закрытой структур KcsA. По оси OX отложена координата точки на оси канала (нулевое значение соответствует S0 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

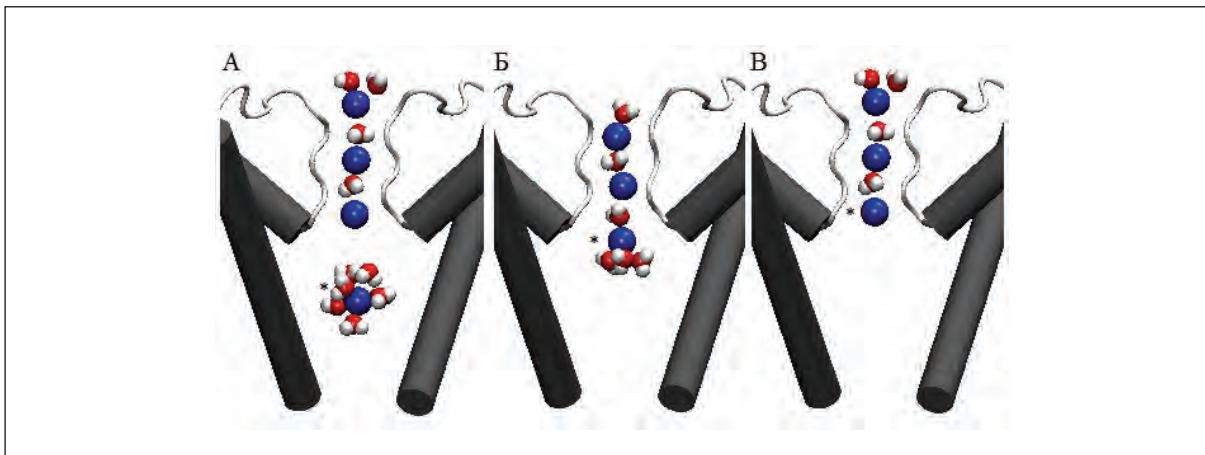


Рис. 6. Цикл проведения ионов калия через KcsA.

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.

полость канала, заполненную водой. В открытой структуре радиус поры канала на уровне лейцинового гидрофобного кольца составляет 5 Å.

Для моделирования процесса переноса ионов через пору канала, на основании трехмерной структуры канала в открытом состоянии была построена модель канала KcsA в фосфолипидной мембране. Была использована модель мембраны, состоящая из липидов ДПФХ, расчетная ячейка содержала 260 молекул фосфолипида. Структура ионного канала была помещена внутрь липидного бислоя. Концевые аминокислотные остатки каждой из субъединиц ионного канала дополнялись заглушкам N-метиламина с N-конца и ацетильными группами с С-конца. Положение заглушек фиксировалось в пространстве гармоническим потенциалом с константой жесткости  $4.0 \text{ ккал/моль/Å}^2$ . Заглушки необходимы, так как концевые аминокислоты для данной структуры в реальном калиевом канале KcsA не свободны, а находятся в белковой цепи. Далее в систему были добавлены молекулы растворителя (использовалась модель воды TIP3P), и ионы калия и хлора.

Для моделирования процесса проведения ионов через пору канала, построенная структура была отрелаксирована в течение 6 нс. Расчеты молекулярной динамики проводились 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.

В процессе молекулярной динамики ионы калия проходили через пору канала из области с более высоким значением электростатического потенциала в область с более низким. Процесс проведения иона калия выглядит следующим образом (рисунок 6): 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. 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.

На основе сделанных расчетов молекулярной динамики были построены кривые вольтамперной характеристики калиевого канала, которые приведены на рисунке 7. Там же приведены экспериментальные данные, полученные для единичного KcsA [32].

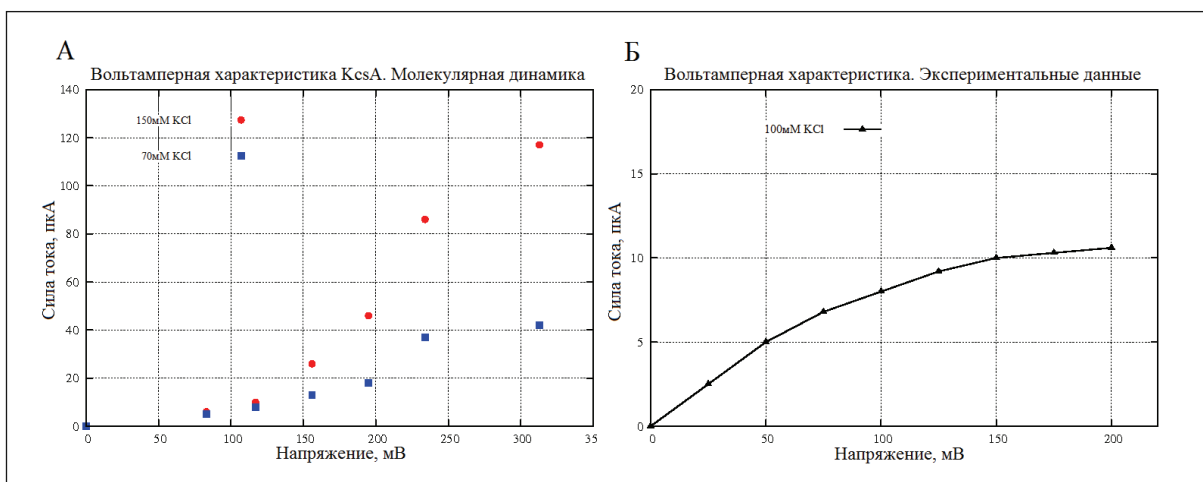


Рис. 7. Графики вольтамперной характеристики KcsA.

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[32]. Данные получены для системы с концентрацией соли калия 100 мМ.

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, 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 коэффициент самодиффузии для использованной модели воды TIP3P больше экспериментального значения в 2.26 раза. Таким образом, поздний выход кривой на плато может быть обусловлен завышенной подвижностью молекул воды рассматриваемой модели. Другим объяснением может быть то, что на значения вольтамперной характеристики оказывает структура канала, используемая для измерения. Как указано выше, концы субъединиц были дополнены заглушками и зафиксированы в пространстве. Таким образом, структура канала остается сравнительно постоянной, и не претерпевает значительных перестроек за времена моделирования. Однако предполагается, что структура канала KcsA динамична и способна переходить между различными подсостояниями, характеризующимися разной скоростью проведения ионов калия. Таким образом, значения, получаемые экспериментально, будут усреднены с учетом термодинамической вероятности нахождения канала в том или ином состоянии.

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 8А). 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 8Б). В последнем случае ионы не разделены молекулами воды. Подобное поведение ионов калия в СФ было показано ранее для калиевого канала Kv1.2 [33, 34].

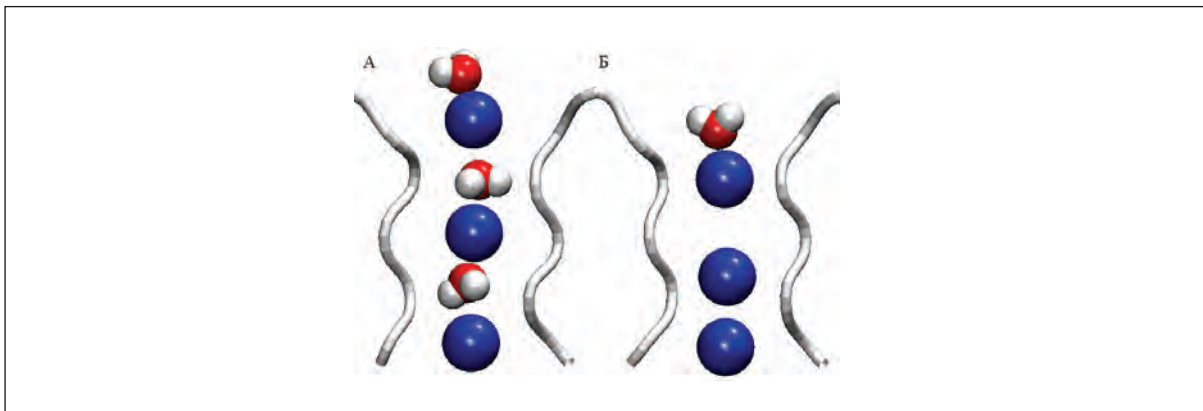


Рис. 8. Два механизма проведения ионов через СФ.

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.

Таким образом для системы открытого калиевого канала KcsA в липидном бислое было произведено моделирование процесса проведения ионов калия через канал под действием внешнего электростатического поля. В результате проведенных расчетов, были показаны два различных механизма проведения ионов через селективный фильтр, отличающиеся величиной ионного тока, что находится в соответствии с известными литературными данными. Были построены кривые вольтамперной характеристики и произведено сравнение с известными экспериментальными данными.

### Литература

1. Aksimentiev A., Brunner R., Cohen J., Comer J., Cruz-Chu E., Hardy D., Rajan A., Shih A., Sigalov G., Yin Y., Schulten K. *Computer modeling in biotechnology: a partner in development*. Methods Mol. Biol., 2008, 474, 181-234.
2. Cuesta J.A., D. Frenkel. *Monte Carlo simulation of two-dimensional hard ellipses*. Phys. Rev., 1990, 42, 2126-2136.
3. Park K. *Nanotechnology: What it can do for drug delivery*. J. Control Release, 2007, 120, 1-3.
4. Lu D., Aksimentiev A., Shih A.Y., Cruz-Chu E., Freddolino P.L., Arkhipov A. Schulten K. *The role of molecular modeling in bionanotechnology*. Phys. Biol., 2006, 3, 40-53.
5. Park S., Schulten K. *Calculating potentials of mean force from steered molecular dynamics simulations*. J. Chem. Phys., 2004, 120, 5946-5961.
6. Rosales-Hernandez M.C., Bermudez-Lugo J., Garcia J., Trujillo-Ferrara J., Correa-Basurto J. *Molecular modeling applied to anti-cancer drug development*. Anticancer Agents Med. Chem., 2009, 9, 230-238.
7. T.E. Cheatham III, P.A. Kollman, *Molecular dynamics simulation of nucleic acids*. Annu. Rev. Phys. Chem., 2000, 51, 435-471.
8. Gumbart J., Wang Y., Aksimentiev A., Tajkhorshid E., Schulten K., *Molecular dynamics simulations of proteins in lipid bilayers*. Curr. Opin. Struct. Biol., 2005, 15, 423-431.
9. Khalili-Araghi F., Gumbart J., Wen P.C., Sotomayor M., Tajkhorshid E., Schulten K., *Molecular dynamics simulations of membrane channels and transporters*. Curr. Opin. Struct. Biol., 2009, 19, 128-137.
10. Sotomayor M., Schulten K. *Single-molecule experiments in vitro and in silico*. Science, 2007, 316, 1144-1148.
11. Isralewitz B., Gao M., Schulten K. *Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins*. Curr. Opin. Struct. Biol., 2001, 11, 224-230.
12. Alder B.J., Wainwright T.E., *Phase transition for a hard sphere system*. J. Chem. Phys. 1957, 1208-1209.
13. Rahman A. *Correlations in the motion of atoms in liquid argon*. Phys. Rev., 136A, 1964, 405-411.
14. McCammon J.A., Gelin B.R., Karplus M. *Dynamics of folded proteins*. Nature, 267, 1977, 585-590.
15. Wang J., Cieplak P., Kollman P.A. *How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules?* J. Comput. Chem., 21, 2000, 1049-1074.

16. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminatan S., Karplus M. *CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations*. J. Comput. Chem., 93, 1983, 2487–2502.
17. Levitt M., Hirshberg M., Sharon R., Daggett V. *Potential energy function and parameters for simulations of the molecular dynamics of proteins and nucleic acids in solution*. Comp. Phys. Commun., 91, 1995, 215–231.
18. van Gunsteren W.F., Berendsen H.J.C. *Computer Physics Communications*. Biomos BV, Groningen, 1987.
19. Nelson M., Humphrey A., Gursoy A., Dalke A., Kale R.D., Skeel R.D., Schulten K. *NAMD – a parallel, object-oriented molecular dynamics program*. Int. J. Supercomput. Appl. High Perform. Comput., 10, 1996, 251–268.
20. Шайтан К.В. *Конформационная подвижность белка с точки зрения физики*. Соросовский Образовательный Журнал. 1999. №5. С.8-13.
21. SJ Singer, a.G.N., *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. 175: p. 720-731.
22. Egberts, E., S.J. Marrink, H.J. Berendsen, *Molecular dynamics simulation of a phospholipid membrane*. Eur Biophys J, 1994. **22**(6): p. 423-36.
23. Рубин, А.Б., . Биофизика: Учебник: В 2-х тт. . Vol. 2. 2004, Москва: Издательство МГУ. 462.
24. Kinnunen, O.M.a.P., *Role of lipid organization and dynamics for membrane functionality*. Birkhäuser, 1996: p. 463-502.
25. PR Cullis, D.F.a.M.H., *Physical properties and functional roles of lipids in membranes*. Elsevier, 1996: p. 1-33.
26. Somerharju, P., J.A. Virtanen, K.H. Cheng, *Lateral organisation of membrane lipids. The superlattice view*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1440**(1): p. 32-48.
27. J.F. Nagle, R. Zhang, S. Tristram-Nagle, W. Sun, H.I. Petrache, R.M. Suter, *X-ray structure determination of fully hydrated L alpha phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers*. Biophys J, 1996. **70**(3): p. 1419-31.
28. Douliez, J.P., A. Leonard, E.J. Dufourc, *Restatement of order parameters in biomembranes: calculation of C-C bond order parameters from C-D quadrupolar splittings*. Biophys J, 1995. 68(5): p. 1727-39.
29. C. Anezo, A.H.d.V., H-D. Holtje, D. P. Tieleman, S-J. Marrink, *Methodological Issues in Lipid Bilayer Simulations*. The Journal of Physical Chemistry B, 2003. 107(35): p. 9424-9433.
30. 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.
31. L. Cuello, V. Jogini, D.M. Cortes, E. Perozo, *Structural mechanism of C-type inactivation in K<sup>+</sup> channels*. Nature, 2010. 466(7303): p. 203-208.
32. LeMasurier, M., L. Heginbotham, C. Miller, *KcsA: it's a potassium channel*. The Journal of General Physiology, 2001. 118(3): p. 303-314.
33. Khalili-Araghi, F., E. Tajkhorshid, K. Schulten, *Dynamics of K<sup>+</sup> ion conduction through Kv1.2*. Biophysical Journal, 2006. 91(6).
34. M. Jensen, D.W. Borhani, K. Lindorff-Larsen, P. Maragakis, V. Jogini, M.P. Eastwood, R.O. Dror, D.E. Shaw, *Principles of conduction and hydrophobic gating in K<sup>+</sup> channels*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. 107(13): p. 5833-5838.

## **MOLECULAR DYNAMICS METHOD IN INVESTIGATION OF PROPERTIES OF BIOLOGICAL OBJECTS**

**K.V. Shaitan, M.Yu. Antonov, A.K. Shaytan, V.N. Novoseleckiy,  
M.E. Bozdaganyan, M.A. Kasimova**

*Lomonosov Moscow State University*  
mikhail.antonov@mail.bio.msu.ru

Received 25.08.2011

It is discussed the modern stage of investigations in the field of computer modeling and study of structural and dynamical properties of systems, imitating biological ones, with usage of the molecular dynamics method.