

УДК 577.3

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА ГИДРАТИРОВАННОГО БИСЛОЯ ПАЛЬМИТОИЛЛЕОИЛФОСФАТИДИЛХОЛИНА В СТОЛКНОВИТЕЛЬНОМ ТЕРМОСТАТЕ

© 2005 г. **Е. В. Турлей, К. В. Шайтан, Н. К. Балабаев\***

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
119992 Москва, Ленинские горы, 1/12; факс: (095) 939-23-74, телефон: (095) 939-23-74,  
электронная почта: uegor@moldyn.org, shaitan@moldyn.org;*

*\*Институт математических проблем биологии РАН  
142290 Московская обл., Пушчина, ул. Институтская, 4; факс: (0967) 33-05-70, телефон: (0967) 73-38-19;  
электронная почта: balabaev@impb.psn.ru*

Поступила в редакцию 1.11.2004 г.

После доработки 8.06.2005 г.

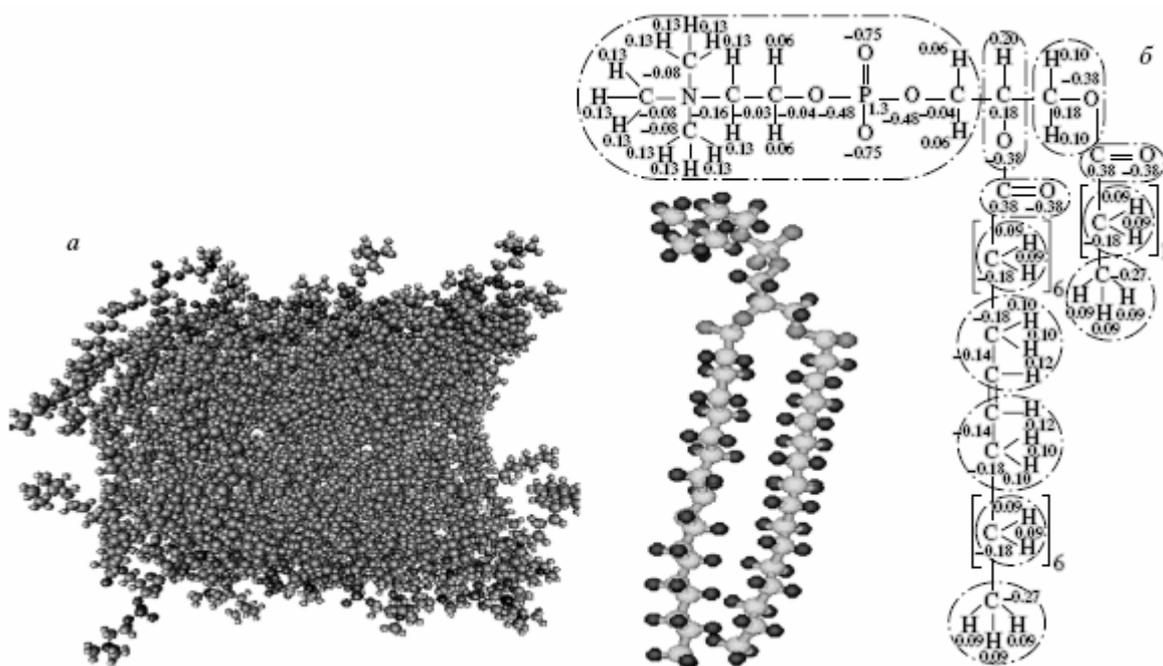
Исследована молекулярная динамика гидратированного бислоя пальмитилолеоилфосфатидилхолина в столкновительном термостате и баростате Берендсена. Рассчитаны удельные поверхностные площади липидов, распределения атомных групп по нормали к мембране, радиальные функции распределения атомов в плоскости бислоя, профили параметра порядка, электростатического потенциала вдоль нормали к мембране, коэффициент латеральной самодиффузии липидов. Отработаны протоколы молекулярно-динамических расчетов, при которых полученные данные находятся в соответствии с экспериментальными данными и данными других вычислительных экспериментов. Обсуждается вопрос о недостижимости термодинамического равновесия в результате численных экспериментов над многоатомными системами. Разработан метод управляемой динамики для вычисления неоднородной микроразрывности мембраны.

Успехи современных молекулярных технологий вызвали значительный интерес к молекулярной динамике (МД) биомембранных структур. Имеющиеся экспериментальные данные и результаты молекулярного моделирования все еще не позволяют в достаточной мере прояснить детальные закономерности микроскопической картины функционирования мембранных структур. В частности, отсутствуют подробные данные о силах поверхностного натяжения, влияющих на формирование и релаксацию неравновесных надмолекулярных структур. Параметры анизотропии вязкости в мембранных структурах известны весьма приблизительно. Последовательное применение методов МД с использованием полноатомных силовых полей, специальных процедур и достаточно длинных траекторий оказывается весьма полезным для уточнения обсуждаемой микроскопической картины [1–3].

В работе изучена динамика протяженной анизотропной структуры на примере полностью гидратированной мембраны пальмитилолеоилфосфатидилхолина (ПОФХ). Моделирование гидратированных бислоев ПОФХ, содержащих порядка сотни молекул липидов, в различных фазах впервые проведено около 10 лет назад [1]. Однако в работах по динамике мембран не всегда уделяется должное внимание методическим аспектам и описанию протоколов расчета, что часто не позволяет

воспроизвести результаты. В нашей статье приведено достаточно полное описание условий и методик, сочетание которых ранее не применялось для МД расчетов данной системы. Проведено сравнение с данными МД, полученными с использованием других силовых полей и условий. В частности, в работе используется высокая степень гидратации мембраны, что позволяет уменьшить эффекты, вызванные введением периодических граничных условий. Для поддержания изотермических условий используется столкновительный термостат [4–6], который не приводит к нелинейным аттракторным режимам, искажающим статистически равновесное распределение энергии по степеням свободы [7, 8].

В работе проведен специальный подбор параметров протокола МД, чтобы поверхностная плотность и толщина моделируемой мембраны соответствовала параметрам реальной структуры. Помимо обычного метода МД разработан и применен вариант метода управляемой динамики (Steered Molecular Dynamics, SMD [9]), который позволяет стимулировать молекулярные процессы по определенным степеням свободы. В результате оказалось возможным оценить величину микроразрывности исследуемых мембран в различных частях анизотропного бислоя. Использование SMD, таким образом, позволяет дать количественную оценку параметрам, характеризующим физичес-



**Рис. 1.** Исследуемая липидная система, а – бислоем ПОФХ; б – распределение зарядов в молекуле липида. Выделены электронеутральные группы.

кие механизмы элементарных актов переноса массы в микрогетерогенных структурах [10].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пакет PUMA [5], используемый ранее для МД вычислительных экспериментов, специально модифицирован для включения управляющих воздействий. Решение системы классических уравнений движения атомов проводилось в полноатомном силовом поле AMBER99 [11]. Мембрана состояла из бислоя 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (ПОФХ), содержащего 64 молекулы липида (рис. 1а). Начальная структура соответствовала перпендикулярному положению оси наибольшей протяженности молекул относительно плоскости мембраны. Углеродный остов остатков жирных кислот при этом находился в конформации полностью-транс (за исключением цис-положения при двойной связи).

Параметры для двойной связи в олеиновом остатке, парциальные заряды в ПОФХ (рис. 1б) брали в соответствии с [12–15]. Использовали модель воды ТРЗР, причем в отличие от большинства работ, валентные связи и валентные углы в молекулах воды не фиксировались. В стартовой конфигурации молекулы воды помещали на расстоянии не менее 2.3 Å от крайних атомов мембраны. Степень сольватации определялась соотношением 44 молекулы воды на молекулу липида, что на треть больше, чем в стандартных методиках, и превышает минимальную достаточную величину полной гид-

ратации, которая обычно принимается равной 27 молекулам воды на липид (см. например [16]).

Радиус обрезания ван-дер-ваальсовых и кулоновских взаимодействий составлял 16 Å. Процедуру сглаживания ван-дер-ваальсовых взаимодействий проводили путем умножения потенциалов Леннарда-Джонса на сглаживающую (переключающую) функцию  $W(r)$ :

$$W(r) = \begin{cases} 1, & r \leq R_{on} \\ \frac{(R_{off}^2 - r^2)^2 (R_{off}^2 - 3R_{on}^2 + 2r^2)}{(R_{off}^2 - R_{on}^2)^3}, & R_{on} < r < R_{off} \\ 0, & r \geq R_{off} \end{cases}$$

где  $r$  – расстояние между взаимодействующими атомами, параметр  $R_{on}$  выбран равным 15 Å,  $R_{off}$  16 Å. Кулоновский потенциал умножен на экранную функцию:

$$W(r) = \begin{cases} (1 - r/R_{off})^2, & r \leq R_{off} \\ 0, & r > R_{off} \end{cases}$$

Диэлектрическая проницаемость равна 1. Для повышения точности расчетов шаг интегрирования брали равным 1 фс, что в 2 раза меньше, чем в часто используемых методиках. Искусственные процедуры ограничения валентных связей типа SHAKE [17] не применяли.

Расчеты проводили с периодическими граничными условиями при постоянной температуре. Использовали как условия постоянных площади бислоя и давления в направлении нормали к мембране (ансамбль  $NP_zAT$ ), так и постоянного давления во всех трех направлениях (ансамбль  $NPT$ ). Давление поддерживали баростатом Берендсена [18] с одинаковой для всех трех направлений частотой, которая варьировала от  $0.1$  до  $1 \text{ пс}^{-1}$ . С учетом эффектов поверхностного натяжения бислоя латеральная компонента давления баростата бралась отрицательной [19]. Для поддержания постоянной температуры  $300 \text{ К}$  использовали виртуальную столкновительную среду [5, 6]. Средняя частота столкновений с виртуальными частицами составляла  $10 \text{ пс}^{-1}$ , масса виртуальных частиц  $1 \text{ а.е.м.}$

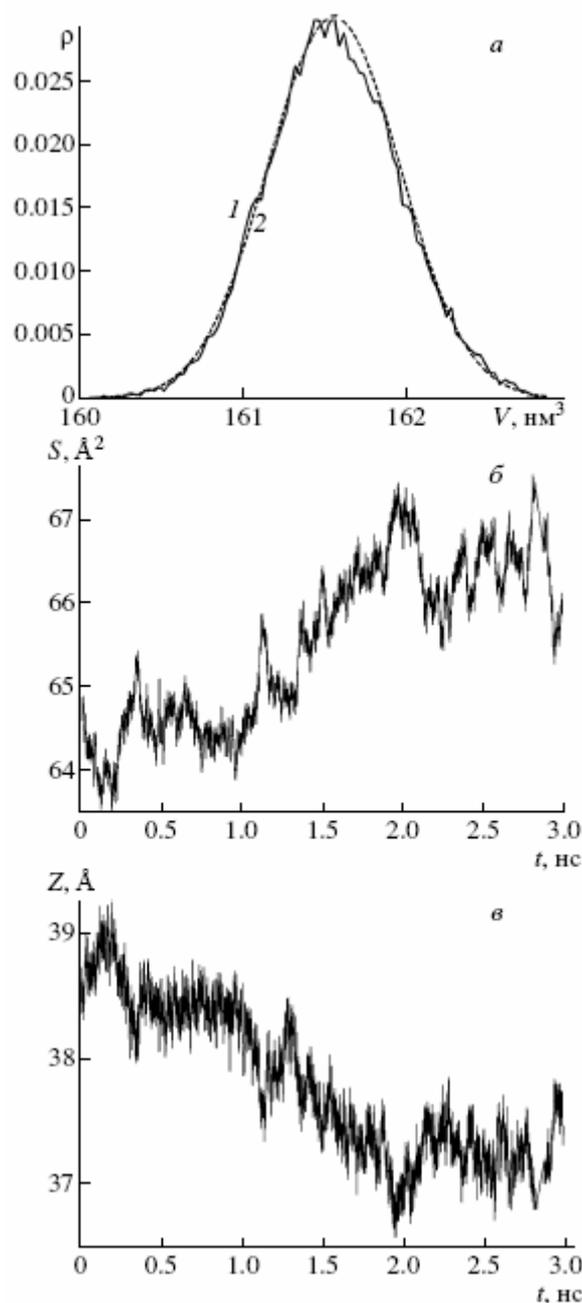
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Релаксация бислоя.** Бислой ПОФХ подвергался многоступенчатой релаксации. Предварительную релаксацию бислоя проводили при температуре  $T = 300 \text{ К}$  и изотропном баростатировании при давлении  $1 \text{ атм}$  и частоте баростата  $0.2 \text{ пс}^{-1}$ . За время порядка  $250 \text{ пс}$  эффективная площадь поверхности на липид сокращалась от  $64 \text{ \AA}^2$  до  $52 \text{ \AA}^2$ , что существенно ниже экспериментальных значений ( $62\text{--}68 \text{ \AA}^2$  на липид [20–23]). Поэтому мембрану далее специально растягивали за счет линейного увеличения латеральных размеров расчетной ячейки. Такой технический прием позволил привести частично отрелаксированную систему к состоянию, при котором площадь мембраны соответствовала экспериментальному значению. Затем в  $NPAT$ -условиях проводили дальнейшую релаксацию в течение  $750 \text{ пс}$ . Средняя латеральная составляющая давления на данном участке траектории составляла  $-330 \text{ атм}$ . Средняя составляющая в направлении нормали к мембране  $-118 \text{ атм}$ . Далее в течение  $100 \text{ пс}$  проводили релаксацию при частоте баростата  $1 \text{ пс}^{-1}$  и среднем давлении баростата в плоскости  $XY$  (параллельной плоскости мембраны)  $P_x = P_y = -260 \text{ атм}$ , в направлении нормали  $-P_z = 1 \text{ атм}$ . Общее время релаксации составило  $1.1 \text{ нс}$ .

**Флуктуации параметров бислоя.** После процедуры приготовления рабочий участок траектории, по которому проводили усреднение, составлял  $3 \text{ нс}$ .

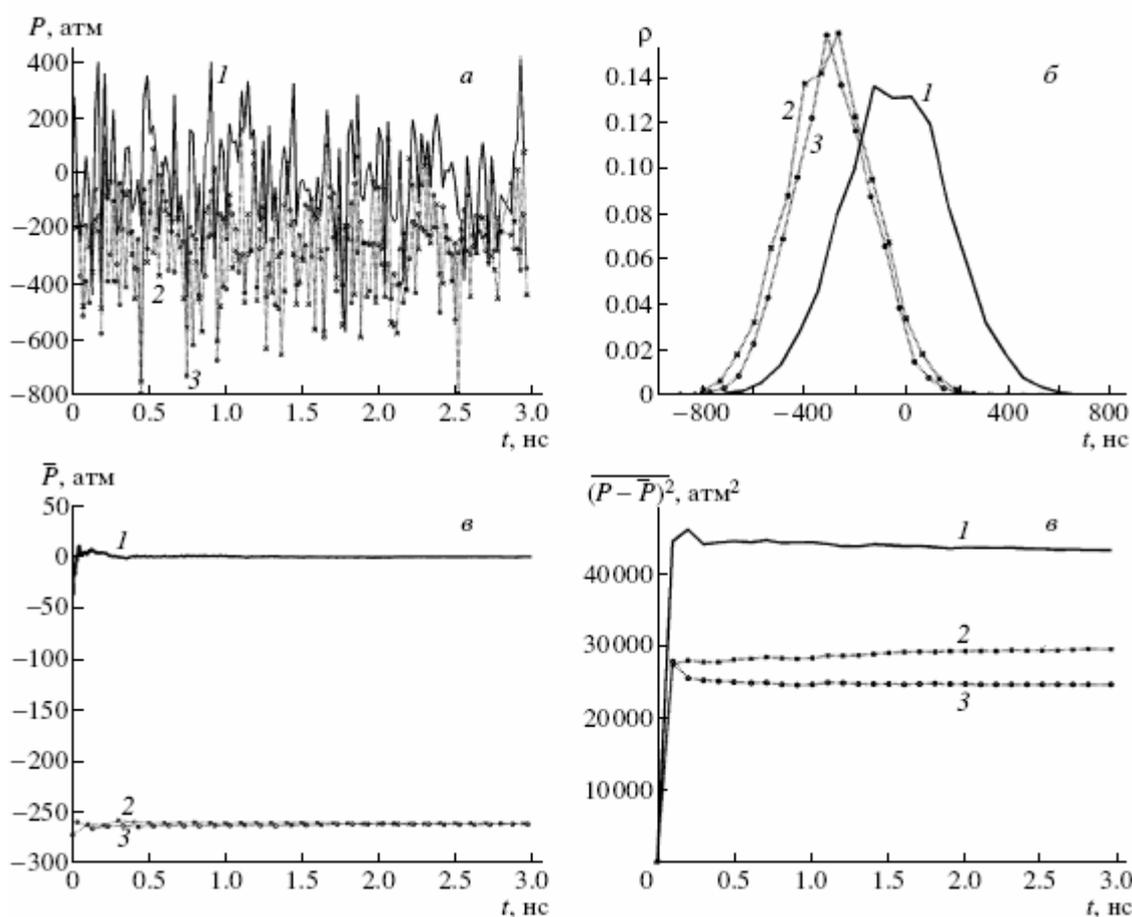
На рис. 2а представлена плотность вероятности значений объема расчетной ячейки. Видно, что разброс значений объема ячейки характеризуется нормальным распределением, а величина стандартного отклонения достигла равновесного значения. Как известно, согласно теории термодинамических флуктуации Эйнштейна, плотность вероятности равновесных флуктуации объема  $\rho(\Delta V)$  задается гауссовским распределением

$$\rho(\Delta V) = A_V e^{-\frac{(\Delta V)^2}{2\Delta V^2}},$$



**Рис. 2.** Параметры расчетной ячейки, а – плотность вероятности значений объема расчетной ячейки (1) и гауссовская аппроксимация кривой 1 (2); б – флуктуации удельной поверхностной площади липидов; в – флуктуации толщины бислоя ПОФХ. Приведен рабочий участок траектории. Средние значения величин на (б) и (в) –  $65.4 \text{ \AA}$  и  $37.9 \text{ \AA}$  соответственно.

где  $A_V$  — нормировочный множитель,  $\overline{\Delta V^2} = k_B T V \chi_T$  — дисперсия, а  $\chi_T$  — коэффициент изотермического сжатия системы. Полученное в расчете стандартное отклонение значений объема от среднего составило  $0.25\%$ , что дает величину  $\chi_T$ , равную  $2.34 \times 10^{-10} \text{ Па}^{-1}$ . Это приблизительно в 2 раза меньше



**Рис. 3.** Давление в расчетной ячейке. Флуктуации компонент давления по трем осям ячейки (а); распределения компонент давления (б); кинетика изменения среднего значения давления (в); кинетика изменения дисперсии давления (г). 1 – компонента  $P_x$ , 2 – компонента  $P_y$ , 3 – компонента  $P_z$ .

сжимаемости воды. Таким образом, разумное значение  $\chi_T$  для исследуемой системы, которое является средним для воды и самой мембраны (согласно [24],  $\chi_T$  липидных мембран может лежать в диапазоне от  $1 \times 10^{-10}$  до  $6 \times 10^{-10}$  Па<sup>-1</sup>), а также гауссовский характер распределения свидетельствуют о достижении локального равновесия при флуктуациях объема.

Флуктуации удельной площади и толщины мембраны приведены на рис. 26, в. Амплитуда изменения значений удельной площади составляет  $4 \text{ \AA}^2$ , тогда как в других численных экспериментах по ПОФХ мембранам на масштабах времени на порядок больше наблюдается размах от 4 до  $8 \text{ \AA}^2$  [25]. Величина флуктуации площади составляет 1.45% от среднего значения. В равновесии средняя величина флуктуации площади определяется формулой  $\sqrt{k_B T \frac{1}{K_A} A}$  где  $K_A$  – модуль упругости бислоя,  $A$  – среднее значение площади. По данным эксперимента [26] для нескольких типов мембран величина  $K_A$  составляет 115–200 дин/см. В этом случае флуктуации площади должны были бы со-

ставить 3.15–4.15% от среднего значения площади. Таким образом, характер флуктуации площади бислоя также указывает на достижение определенного локального равновесия.

Отметим, что на рис. 26, в масштаб по вертикали специально растянут (это важно при сравнении с данными [25]).

Толщину мембраны на рис. 2в определяли вычитанием усредненной толщины слоя воды с плотностью  $1.015 \text{ г/см}^3$  (плотность воды ТПЗР при данных условиях) из суммарной толщины ячейки. Толщину мембраны можно также характеризовать средним расстоянием между атомами определенного типа в различных монослоях. Так, среднее расстояние между атомами фосфора составило  $36.8 \text{ \AA}$ , азота –  $38.7 \text{ \AA}$  (данные вычислительных экспериментов [16] отличаются от этих значений на  $1\text{--}2 \text{ \AA}$  в меньшую сторону).

Значения компонент давления в расчетной ячейке сильно флуктуируют (рис. 3а, б), но их средние и дисперсии довольно быстро выходят на стационарные значения (рис. 3в, г).

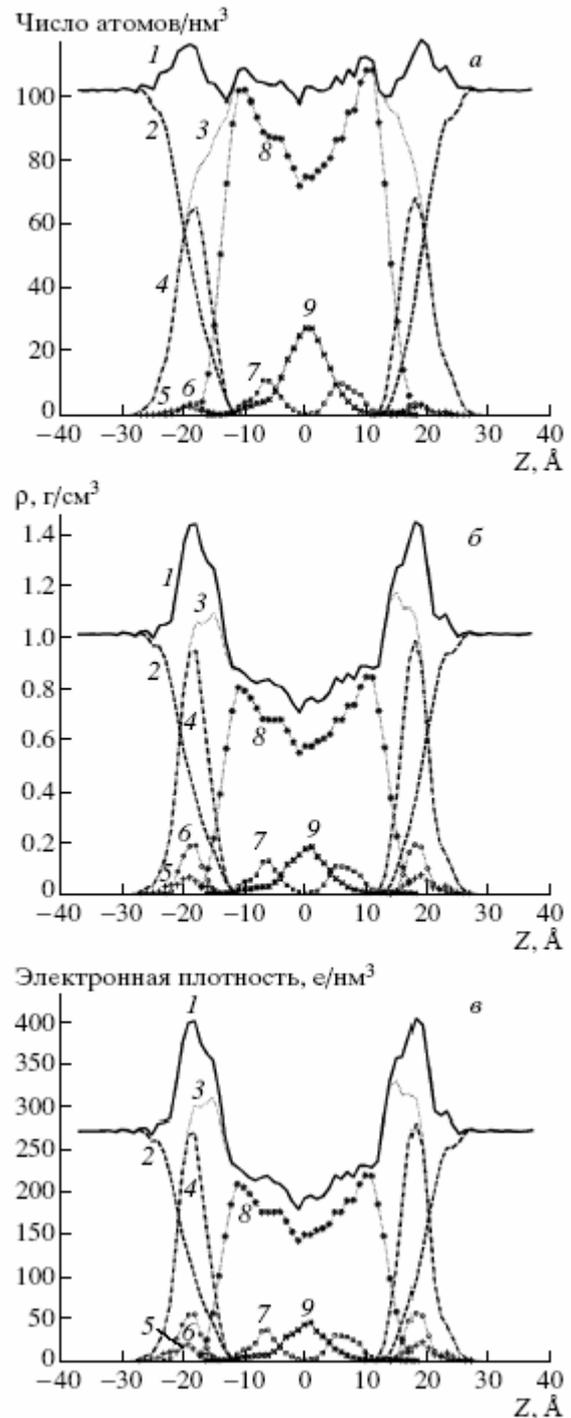
Таким образом, для поддержания поверхностной плотности липидов и толщины бислоя на уровне экспериментальных значений (62–68 Å<sup>2</sup> на липид [20–23] и 35–54 Å [27–30] соответственно) в рамках нашей методики требуется создание эффективного отрицательного латерального давления. Использование анизотропного баростата, силового поля AMBER99, столкновительного термостата с частотой 10 пс<sup>-1</sup> и массой виртуальных частиц 1 Да, радиусов обрезания кулоновских взаимодействий 16 Å и ван-дер-ваальсовых взаимодействий 15–16 Å обеспечивает заданное значение макропараметров.

Флуктуации описанных выше параметров характеризуют достигнутое локальное равновесие. Отметим, что достижение истинного равновесия в мембранных (и в любых многоатомных) системах при МД-расчетах практически невозможно. Однако в системе существует иерархия времен релаксаций по разным степеням свободы, в том числе и макроскопическим. Характерное время релаксации обсуждаемых выше параметров не превышает 500 пс. Время релаксации скоростей не превышает долей пс. С этой точки зрения, процессы (например диффузия), чувствительные к флуктуациям обсуждаемых выше параметров, могут на больших масштабах времени восприниматься как квазиравновесные.

**Поверхностное натяжение бислоя.** Обсудим наблюдаемое сжатие мембраны в изотропном баростате. Это обусловлено эффектами поверхностного натяжения. Поверхностное натяжение чувствительно к параметрам силового поля, которые в настоящее время известны недостаточно точно. Для компенсации эффектов поверхностного натяжения при баростатировании необходимо использовать отрицательное давление, что неоднократно обсуждалось ранее [1, 19, 31, 32]. Согласно оценкам [19], поверхностное натяжение порядка 56 дин/см в бислое дипальмитоилфосфатидилхолина должно вызвать отрицательное латеральное давление порядка –100 атм [33] в соответствии с формулой

$$\gamma = \int_{z_1}^{z_2} [P_N(Z) - P_T(Z)] dz,$$

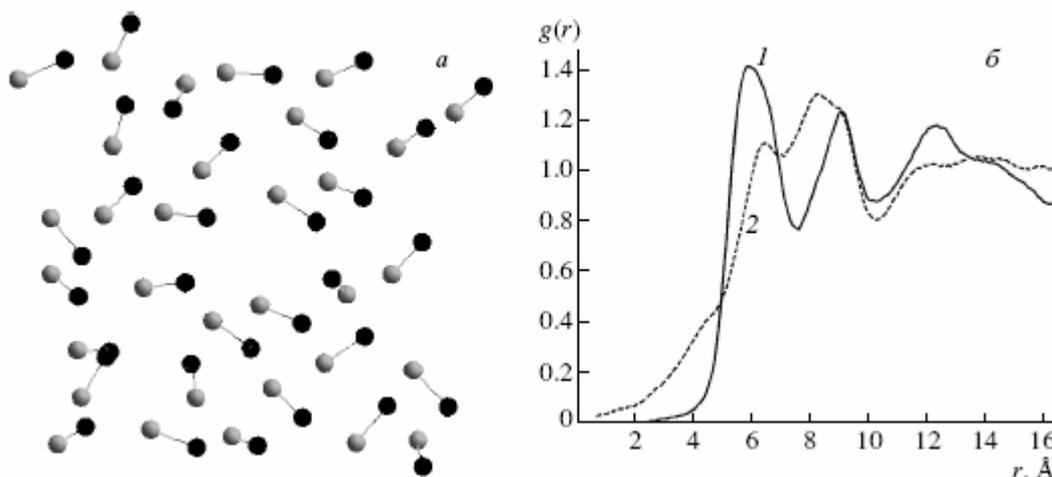
где  $\gamma$  – поверхностное натяжение, ось  $Z$  – нормаль к плоскости мембраны,  $P_N$  – давление в направлении нормали к мембране,  $P_T$  – давление, тангенциальное по отношению к поверхности мембраны, а  $z_1$  и  $z_2$  – границы мембраны (вместе с первым гидратным слоем) по оси  $Z$ . Имеющееся различие между использованным в работе значением давления и теоретической оценкой могут быть связаны с погрешностями параметров силового поля. Отметим, что вопрос о выборе параметров в настоящее время принципиально не может быть решен



**Рис. 4.** Распределение атомной (а), массовой (б), электронной плотности (в). 1 – система в целом, 2 – вода, 3 – липид, 4 – липидные головы, 5 – атомы азота, 6 – атомы фосфора, 7 – HC = CH–группа олеиловой цепи, 8 – CH₂–группы алкильных цепей, 9 – концевая CH₃–группа алкильных цепей.

однозначно, и необходимо накапливать опыт расчетов в различных силовых полях.

Дополнительное влияние на поверхностную плотность и толщину мембраны оказывают пара-



**Рис. 5.** Характеристики расположения голов липидов в плоскости бислоя. а – распределение атомов азота и фосфора в одном из слоев мембраны. Ортогональная проекция. Черным отображены атомы фосфора, светлым – азота. Показаны также векторы, соединяющие атом фосфора и атом азота в пределах одной молекулы липида; б – радиальные функции распределения атомов азота и фосфора в плоскости мембраны. 1 – P-P, 2 – N-N. Участок графика при  $r < 0.5$  статистически менее достоверен, чем при больших  $r$ , и не показан.

метры МД протокола. Так, бислоем ПОФХ в силовом поле AMBER 4.0 [34] при радиусе обрезания кулоновских сил  $12 \text{ \AA}$ , температуре  $310 \text{ K}$  (термостат Берендсена, параметр частоты  $2.5 \text{ ps}^{-1}$ ) и при изотропном давлении  $1 \text{ атм}$  (баростат Берендсена, параметр частоты  $1.67 \text{ ps}^{-1}$ ) характеризуется удельной площадью  $64.3 \pm 0.3 \text{ \AA}^2$  [35], что также соответствует экспериментальным значениям.

**Распределения атомных групп и характер укладки атомов в плоскости бислоя.** Следует отметить, что согласование удельной поверхностной площади липидов и толщины мембраны с экспериментальными значениями часто является основным критерием реалистичности модели. Более тонкое согласование моделей осуществляется и по другим важным параметрам. В первую очередь, это касается функций распределения по нормали к мембране усредненных электронной плотности и плотности атомных групп. Аналогичные зависимости вычисляли для дипальмитоилфосфатидилхолиновых [36], диолеилфосфатидилхолиновых [37] и ПОФХ [20] мембран. На рис. 4 представлены распределения трех типов: усредненных атомной, массовой и электронной плотностей.

Характер нерегулярной укладки атомов фосфора и азота липидных голов в плоскости мембраны изображен на рис. 5а.

В работе изучали также радиальные функции распределения атомов  $g(r)$  в плоскости мембраны, которые определяют вероятность нахождения атома определенного типа на заданном расстоянии от другого атома в проекции на плоскость мембраны. Число атомов  $dN$ , находящихся в круговом слое площадью  $dS$  и толщиной  $dr$  на расстоянии  $r$

от центрального атома ( $N$  – общее число атомов данного типа) связано с  $g(r)$  формулой

$$dN = Ng(r) \frac{dS}{S} = \frac{N}{S} g(r) 2\pi r dr.$$

На рис. 5б представлены радиальные функции распределения для атомов фосфора и атомов азота в плоскости мембраны (усреднение вели по обоим слоям мембраны). Два главных максимума находятся на  $5.9$  и  $9.1 \text{ \AA}$  для атомов фосфора и  $6.4$  и  $8.2 \text{ \AA}$  для атомов азота. Радиальная функция распределения атомов азота демонстрирует возможность довольно близкого (на расстоянии менее  $1.5 \text{ \AA}$ ) нахождения атомов азота в слое липидных голов. При этом толщина слоя гидрофильных голов липидов такова, что позволяет разместить на разной глубине в мембране относительно слабо заряженные и отталкивающиеся друг от друга атомы азота. Отметим, что сильно заряженные атомы фосфора на таком близком расстоянии располагаться не могут.

Интегрирование радиальных функций распределения дает следующие координационные числа для первой координационной сферы:  $1.91$  для атомов фосфора и  $1.52$  для атомов азота. Во второй координационной сфере –  $2.42$  для атомов фосфора и  $3.03$  для атомов азота. Характер кривых на рис. 5б указывает на отсутствие дальнего порядка в упаковке голов липидов.

**Параметры порядка.** По результатам МД-расчетов определяли параметр порядка  $S_{CD}$  (рис. 6), который может быть также получен экспериментально из данных ЯМР-спектроскопии для дейтерированных липидов. Усредненные значения параметра порядка могут быть получены и по дан-

ным ИК-спектроскопии [38]. Параметр порядка С-Н-связей в алкильной части липида вычисляется следующим образом:

$$S_{CH}(i) = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta_i - 1 \rangle,$$

где  $\theta_i$  – угол между С-Н-связью при  $i$ -том атоме углерода в алкильной цепи и нормалью к мембране, а угловые скобки обозначают усреднение по времени. Максимальное значение этой величины 1 (когда все связи параллельны нормали), минимальное –0.5 (все связи лежат в плоскости мембраны). Полученные средние значения  $-S_{CH}$  для обеих углеводородных цепей липида превышают значения, полученные в экспериментах [39–46] и других МД-расчетах [1, 47, 48] на 0.02–0.03. Это обусловлено, по-видимому, конечным радиусом обрезания электростатических взаимодействий. Чем меньше радиус обрезания, тем более упорядочены липидные цепи [25]. Рассчитанные значения  $-S_{CH}$  для начального участка пальмитоиловой цепи уменьшаются в направлении липидных голов. Это соответствует, за исключением второго атома углерода, экспериментальным данным [40], а также МД-расчетам [1, 48]. Однако экспериментальные значения  $-S_{CH}$ , согласно [41–43], возрастают по мере приближения к липидным головкам. Наилучшее согласование по профилю параметра порядка для пальмитоила с другими МД расчетами наблюдается с данными [1]. С другой стороны, наилучшее согласование с экспериментальными данными показано для результатов измерений [46]. В целом, картина изменения расчетных значений  $-S_{CH}$  вдоль пальмитоиловой цепи в составе липида остается похожей на профиль  $-S_{CH}$  для свободной молекулы н-гексадекана [49]. Полученный профиль  $-S_{CH}$  для олеиловой цепи в целом также согласуется с экспериментальными данными [40] и компьютерными расчетами других авторов [1, 16, 35, 50, 51]. Особенно хорошее согласование достигается для поведения  $-S_{CH}$  на участке в центре цепи (атомы углерода 8–13) и для спада значений  $-S_{CH}$  по мере удаления от центра цепи к свободному концу. Повышение упорядоченности направления связей в начале этой цепи согласуется также с [35, 50, 51].

**Профиль электростатического потенциала.**

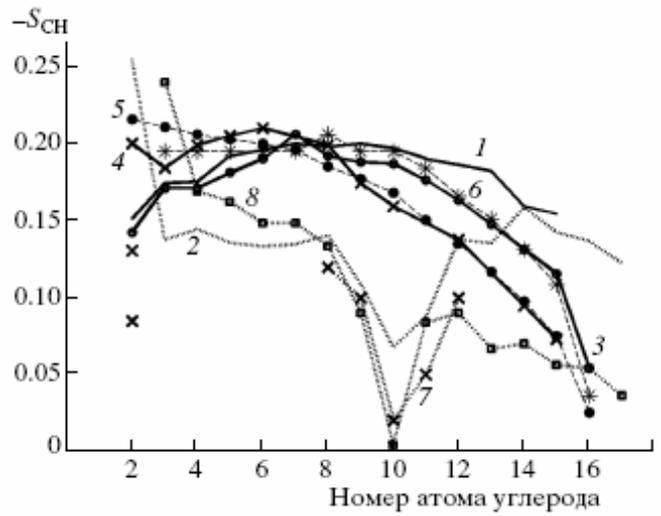
Усредненный электростатический потенциал вдоль нормали к мембране (оси  $Z$ ) вычисляли из уравнения Пуассона  $\Delta\Psi(z) = -\rho(z)/\epsilon_0$ :

$$\Psi(z) = -\int_0^z dz' \int_0^{z'} \rho(z'') dz'' / \epsilon_0$$

где  $\rho(z)$  – плотность заряда вдоль оси  $Z$ , вычисленная с точностью 1 Å. При этом начальные условия брали по соображениям симметрии в виде:

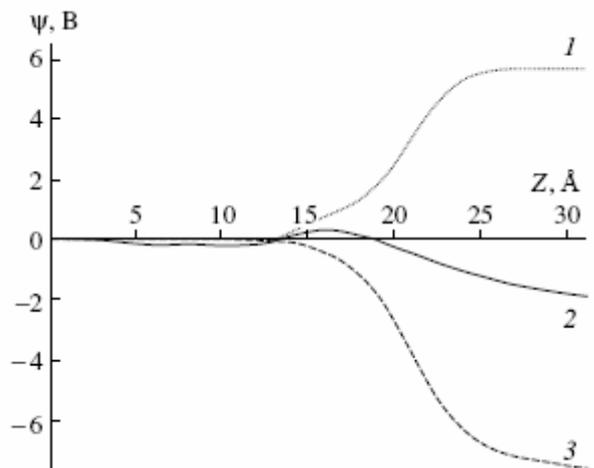
$$\Psi(0) = 0, \quad \frac{d\Psi}{dz} = 0.$$

Профиль потенциала приведен на



**Рис. 6.** Профили параметров порядка для С-Н-связей в пальмитоиловой (С16:0) и олеиловой (С18:1) цепях. 1 – данные МД-расчета для пальмитоиловой цепи, 2 – данные МД-расчета для олеиловой цепи. Другие данные для пальмитоиловой цепи: 3 – [1], 4 – [40], 5 – [41], 6 – [46]; для олеиловой цепи: 7 – [40], 8 – [50, 51].

рис. 7 и качественно согласуется с данными, полученными для липидов другими авторами [19, 25, 52, 53], в том числе и для ПОФХ [46, 50, 54]. Однако абсолютная величина электростатического потенциала в разных работах довольно сильно различается. Сильно сказываются различия в величинах парциальных зарядов. Тем не менее, как упомянуто выше, форма потенциала остается практически одинаковой. Это, по-видимому, обусловлено тем, что зарядовая плотность фосфата и холиновой



**Рис. 7.** Электростатический потенциал (усредненный по монослоям) вдоль нормали к мембране. Потенциал в середине бислоя принят равным нулю (начало оси абсцисс соответствует середине мембраны). 1 – липид, 2 – система в целом, 3 – вода.

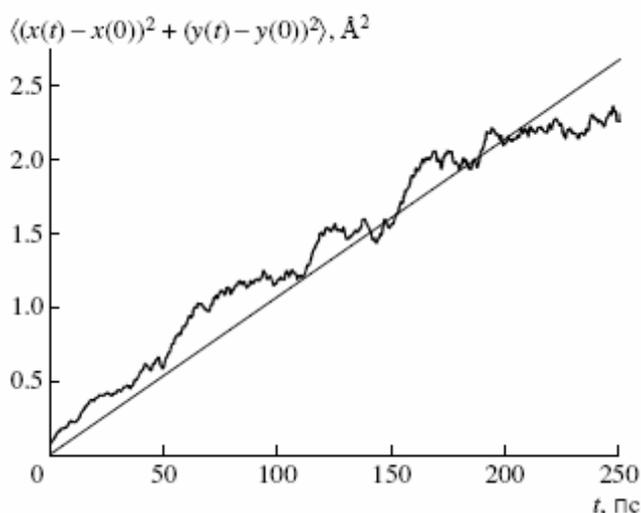


Рис. 8. Средний квадрат смещения центров масс липидов в плоскости бислоя. Прямая – линейная аппроксимация вычисленной кривой.

группы (холиновая группа дает основной вклад в положительный максимум) компенсируется зарядовой плотностью диполей воды (диполи молекул воды на поверхности мембраны слегка ориентированы в сторону мембраны [55]). Более того, потенциал, связанный с ориентационной поляризацией воды, нейтрализует положительный потенциал зарядов атомов липидов вблизи поверхности раздела и изменяет полярность мембраны по сравнению с негидратированными образцами. Экспериментальные оценки потенциала фосфатидилхолиновых мембран на границе раздела с водой составляют от  $-200$  до  $-575$  мВ [56–58].

**Латеральная диффузия липидов и микровязкость мембраны.** Коэффициент латеральной самодиффузии липидов ( $D_{xy}$ ) определяли через коэффициент линейной аппроксимации зависимости

$$\langle (x(t) - x(0))^2 + (y(t) - y(0))^2 \rangle = 4D_{xy}t,$$

где в угловых скобках находится квадрат отклонения центра масс липида в плоскости бислоя. Усреднение проводится по всем липидам. Траектория поделена на 12 участков по 250 пс. Зависимости квадрата смещения (рис. 8) получали в результате усреднения по 12 участкам.

Вычисленное значение  $D_{xy} = 2.4 \times 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с, что близко к данным по квазиупругому рассеянию нейтронов на бислоях дипальмоилфосфатидилхолина ( $1 \times 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с [59]) и диолеилфосфатидилхолина ( $2 \times 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с [60]). Результаты импульсного ЯМР для бислоев ПОФХ дают значения  $2.0 \times 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с при 298 К и  $2.5 \times 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с при 303 К [61]. Отметим, что полученное значение коэффициента латеральной диффузии оказалось гораздо ближе к экспериментальным значениям, чем коэффициенты, получаемые в МД-расчетах в рамках тяжелоатомной мо-

дели дипальмоилфосфатидилхолиновых бислоев ( $3 \pm 0.6 \times 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с [53];  $4.0\text{--}4.5 \times 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с [35]) и бислоя ПОФХ ( $7.3 \times 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с [1]).

Кинетические свойства мембраны были изучены также с помощью метода управляемой МД. В рамках этого подхода к некоторым частям системы прикладываются дополнительные силы (постоянные или переменные). Брали пробные сферы массой 18 Да с радиусами 2 и 4 Å (порядка радиуса атома углерода и небольшой функциональной группы соответственно), которые взаимодействовали с остальными атомами только посредством ван-дер-ваальсовых сил (константа взаимодействия  $\epsilon = 0.15$  ккал/моль). К пробным сферам прикладывалась дополнительная постоянная сила  $F_{ext}$ , действующая в направлении нормали к мембране. Ее величина составляла от 0.3 до 4 ккал/мольÅ<sup>-1</sup> (1 ккал/мольÅ<sup>-1</sup>  $\sim 7 \times 10^{-6}$  дин). Согласно проведенным тестовым расчетам, в воде ТРЗР сферы радиуса 2 и 4 Å при внешней постоянной силе 10 ккал/мольÅ<sup>-1</sup> движутся со средними скоростями 10 и 2.6 Å/пс соответственно. Отметим, что гидродинамическое соотношение Стокса, справедливое, строго говоря, в приближении сплошной среды при этом несколько нарушается.

Расчет траекторий проводили до первого полного прохода ван-дер-ваальсовых сфер через мембрану, но не более 2 нс. Сферы радиусом 2 Å при силе 1–10 ккал/мольÅ<sup>-1</sup> проникали через мембрану за заданное время. В остальных случаях сферы оставались на поверхности либо успевали только погрузиться в мембранный слой (случай с  $r = 2$  Å,  $F_{ext} = 0.3\text{--}0.6$  ккал/мольÅ<sup>-1</sup> и  $r = 4$  Å,  $F_{ext} = 1\text{--}4$  ккал/мольÅ<sup>-1</sup>). При силе менее 1 ккал/мольÅ<sup>-1</sup> влияние возмущений среды на сферу радиусом 4 Å сравнимо с величиной приложенной силы, и в ряде случаев пробная молекула отклонялась от начального положения в противоположную от мембраны сторону на расстояние до 2 Å.

При величине силы больше критического значения молекула проникает в мембрану. Скорость проникновения зависит от отношения приложенной силы к радиусу молекулы (сферы). При этом смещение молекулы определяется в основном дрейфом под действием внешней силы, а вклад диффузии крайне мал. Локальный коэффициент трения оценивается как отношение величины приложенной силы к скорости дрейфа

$$\gamma = \frac{F_{ext}}{v}.$$

Коэффициент трения удобно пересчитать в терминах микровязкости среды исходя из известного соотношения Стокса или в терминах коэффициента диффузии с помощью соотношения Эйнштейна

$$D = \frac{k_B T}{\gamma},$$

В рассматриваемой постановке вычислительного эксперимента определяли микровязкость мембраны при движении частицы по нормали к поверхности. Об этой величине в настоящее время мало что известно. Экспериментально известна усредненная величина вязкости поверхностного слоя, составляющая от 30 до 190 сПз для различных липидных мембран [62–64]. Для ПОФХ экспериментально оценена усредненная вязкость, равная примерно 18 сПз [65]. Однако эти средние значения не дают возможности предсказать значения нормальной составляющей.

Поскольку значения микровязкости различны для разных участков мембраны, целесообразно выделить несколько структурно и динамически неоднородных областей мембраны. В первом приближении можно выделить области липидных голов и алкильных цепей. На рис. 9 приведены графики зависимости вязкости различных частей системы, полученные при различных значениях внешней силы, действующих на частицу радиуса 2 Å.

Рассчитанные значения вязкости воды (порядка 0.3–0.4 сПз) в 2–3 раза меньше экспериментального значения и согласуются с известными оценками вязкости воды в модели ТРЗР [66]. Вязкость мембраны в направлении нормали не превышает 4 сПз. Вязкость в центральной части бислоя оказывается в несколько раз меньше этого значения. При больших силах система становится неравновесной, и линейность формулы Стокса нарушается. В целом, полученные результаты свидетельствуют о не-newтоновском характере среды и слабой неравновесности данной системы при скорости движения 1–10 Å/пс. Относительная микровязкость мембраны для небольших молекул в направлении нормали, по-видимому, в несколько раз (возможно, и на порядок) ниже, чем в латеральном направлении. Однако этот вопрос требует дополнительного исследования, выходящего за рамки данной работы.

### ОБСУЖДЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ ДЛИНЫ ТРАЕКТОРИИ

В последнее время часто обсуждается вопрос о достижении равновесия в ходе МД-релаксации относительно больших систем. В данной работе мы используем траектории длиной 3 нс. С другой стороны, уровень вычислительных мощностей позволяет получать для биомембран, например, 20 нс-траектории похожих систем (ранее уже упоминалась работа [25]). Чем длиннее траектория, тем, в принципе, более надежным и более значимым (в том числе и с биологической точки зрения) должен быть и результат. Однако следует учитывать, что часто "рекордные" траектории делаются за счет значительных упрощений. Известны следующие часто используемые приближения, влияющие на

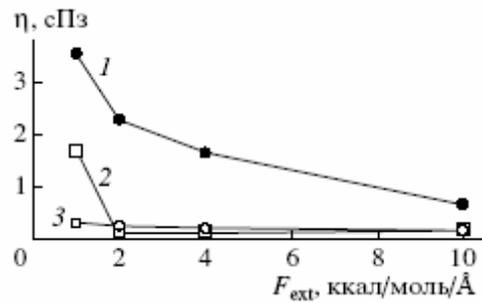


Рис. 9. Вязкость в системе ПОФХ-вода. Радиус пробной ван-дер-ваальсовой сферы 2 Å. Давление в латеральном направлении –300 атм, в направлении нормали 1 атм. Проводилась предварительная релаксация системы в течение 500 пс. 1 – липидные головы, 2 – алкильные хвосты, 3 – вода.

ошибки в МД-расчетах. Использование термостатов со знакопеременным нелинейным трением (которые дают систематические ошибки, связанные с неравномерным распределением энергии по степеням свободы); тяжелоатомное приближение для алкильной части липидов; большой шаг интегрирования; алгоритмы фиксации отдельных степеней свободы; уменьшение частоты и огрубление способов пересчета парных взаимодействий при интегрировании уравнений движения. Следует отметить, что с увеличением длины траектории происходит накопление ошибок, связанных с упрощением модели. Возникает вопрос, какова оптимальная длина траектории?

Приведем простую выкладку в связи с проблемой достижения термодинамического равновесия при МД-расчетах. В цепочке из 100 атомов число состояний, близких по энергии, составляет примерно  $3^{100}$ . Для достижения равновесия система должна за время расчета побывать множество раз во всех доступных областях конфигурационного пространства. Если эти состояния перебирать с частотой 100 ГГц, то потребуется около  $10^{40}$  лет. Напомним, что возраст Вселенной всего лишь около  $10^{10}$  лет. Поэтому совершенно нереально при исследовании биологических структур пытаться генерировать "термодинамически равновесные" траектории. Особенно это нецелесообразно делать за счет качества динамической модели (отметим, что в стандартных методах Монте-Карло с критерием Метрополиса проблема перебора конфигураций выглядит ничуть не лучше). Имеют ли смысл такие расчеты вообще? Как ни странно на первый взгляд, ответ на этот вопрос утвердительный, и при рассмотрении флуктуации этому было дано объяснение.

Распределения флуктуации описанных выше параметров (объема, площади, давления) характеризуют достигнутое локальное равновесие, т.е. равновесие по определенным, в том числе и макроскопическим степеням свободы. Отметим также,

что в численных экспериментах за доли пикосекунд (и это никого не удивляет) достигается равновесное распределение частиц по скоростям. Некоторые из этих параметров рассчитывали в более длительных (порядка 20 нс) вычислительных экспериментах над липидными мембранами [25], и результаты согласуются с приведенными в нашей работе данными. Ранее мы уже отмечали, что достижение истинного равновесия в мембранных (и в любых многоатомных) системах при МД-расчетах практически невозможно. Почему же получается приемлемый с точки зрения термодинамической теории флуктуации результат? Дело в том, что в системе существует иерархия времен релаксаций по разным степеням свободы, в том числе и макроскопическим. С этой точки зрения, при молекулярном моделировании необходимо дожидаться лишь достижения локального равновесия по отношению к процессам с определенным временным масштабом [10, 67].

Таким образом, в результате проведенного исследования мы рекомендуем не увеличивать длину траектории сверх необходимого времени. Это время определяется временами релаксационных процессов, которые должны завершиться в системе по физическому смыслу задачи. Использование вычислительной мощности целесообразнее направить на более точное воспроизведение МД системы при оптимальной длине траектории. Это обстоятельство важно учитывать при создании технологий молекулярного моделирования биологических структур.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе методами МД для полностью гидратированного бислоя ПОФХ определены, в частности, следующие параметры: поверхностная плотность мембраны, толщина бислоя, распределение атомных групп относительно нормали к мембране, радиальные функции распределения атомов в плоскости бислоя, параметры порядка для липидных цепей. МД-расчеты проводили с использованием полноатомного силового поля AMBER99, столкновительного термостата, баростата Берендсена с латеральной составляющей давления  $-260$  атм, радиусов обрезания кулоновских и ван-дер-ваальсовых сил 16 и 15–16 Å соответственно. Показано, что использование столкновительного термостата и баростата Берендсена с анизотропным баростатированием позволяет компенсировать как эффекты поверхностного натяжения, так и естественные погрешности параметризации силового поля. Использование данного МД-протокола позволяет получить мембранную структуру в согласии с данными эксперимента по удельной площади липидов и толщине мембраны. (По этим параметрам обычно калибруют МД-протоколы.) При этом не наблюдается значительных расхождений

для параметров порядка и формы электростатического потенциала с результатами других экспериментов и численных расчетов, использующих несколько иные методики. Коэффициент латеральной диффузии липидов составляет  $2.46 \times 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с и весьма близок к экспериментальным результатам в отличие от многих завышенных значений других вычислений. В целом, использованная выше методика приводит систему к локальному равновесию и практически неизменным дальнейшим распределениям и профилям изученных параметров за время порядка 2 нс.

Развиваемый в работе метод управляемой МД позволяет определить анизотропную микровязкость в разных частях бислоя. Отметим, что заметные скорости проникновения молекул в бислой за времена порядка 1 нс наблюдаются лишь при действии внешней силы, большей некоторой критической величины. Значение величины критической силы возрастает с увеличением радиуса молекулы. При скорости движения, начиная с 1 Å/пс наблюдаются неравновесные эффекты, которые занижают силу трения по сравнению с гидродинамическим соотношением Стокса.

Полученные величины микровязкости для перемещения в направлении нормали к поверхности мембраны небольших молекул оказываются неожиданно низкими и в зависимости от особенностей внешнего силового поля составляют не более 4 сПз, причем центральная область бислоя оказывается примерно на порядок менее вязкой, чем поверхностный слой.

В данной работе мы принципиально отказываемся от попыток генерации так называемых равновесных траекторий (что невозможно). Вместо этого осуществлен контроль за равновесным характером распределений значимых с физической точки зрения величин (скоростей, объема, площади и давления) в масштабе времени интересующих нас процессов.

Авторы признательны Российскому фонду фундаментальных исследований (грант № 04-04-49645), Минобрнауки РФ (гранты И0431, 01.106.11.0001 и 01.165.11.0001), Правительству Москвы за финансовую поддержку.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heller H., Schaefer M., Schulten K. // J. Phys. Chem. 1993. V. 97. P. 8343–8360.
2. Шайтан К.В., Пустошилов П.П. // Биофизика. 1999. Т. 44. № 3. С. 436–441.
3. Балабаев Н.К., Рабинович А.Л., Рунатти П.О., Корнилов В.В. // Ж. физ. химии. 1998. Т. 72. № 4. С. 686–689.
4. Шайтан К.В., Сарайкин С.С. // Ж. физ. химии. 2002. Т. 76. № 6. С. 1091–1096.
5. Lemak A.S., Balabaev N.K. // Mol. Simul. 1995. V. 15. P. 223–231.

6. Lemak A.S., Balabaev N.K. // J. Comp. Chem. 1996. V. 17. P. 1685–1695.
7. Голо В.Л., Шайтан К.В. // Биофизика. 2002. Т. 47. № 4. С. 611–617.
8. Golo V.L., Salnikov V.N., Shaitan K.V. // Phys. Rev. E. 2004. V. 70. 046130.
9. Park S., Schulten K. // J. Chem. Phys. 2004. V. 120. P. 5946–5961.
10. Шайтан К.В. // Биофизика. 1994. Т. 39. № 3. С. 949–967.
11. Wang J., Cieplak P., Kollman P.A. // J. Comp. Chem. 2000. V. 21. P. 1049–1074.
12. Stouch T.K., Ward K.B., Altieri A., Hagler A.T. // J. Comp. Chem. 1991. V. 12. P. 1033–1046.
13. Feller S.E., Yin D., Pastor R.W., Mackerell A.D. Jr. // Biophys. J. 1997. V. 73. P. 2269–2279.
14. Schlenkrich M., Brickmann J., MacKerell A.D. Jr., Karplus M. // Biological membranes: a molecular perspective from computation and experiment /Eds. Merz K.M., Roux B. Boston: Birkhauser, 1996, P. 31–81.
15. Rabinovich A.L., Ripatti P.O., Balabaev N.K. // J. Biol. Phys. 1999. V. 25. P. 245–262.
16. Murzyn K., Rog T., Jezierski G., Takaoka Y., Pasenkiewicz-Gierula M. // Biophys. J. 2001. V. 81. P. 170–183.
17. Ryckaert J.-P., Ciccotti G., Berendsen H.J.C. // J. Comp. Phys. 1977. V. 23. P. 327–341.
18. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R. // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. P. 3684–3690.
19. Chiu S.-W., Clark M., Balaji V., Subramaniam S., Scott H.L., Jakobsson E. // Biophys. J., 1995. V. 69. P. 1230–1245.
20. Pabst G., Rappolt M., Amenitsch H., Laggner P. // Phys. Rev. E. 2000. V. 62. P. 4000–4009.
21. Smaby J.M., Mornsen M.M., Brockman H.L., Brown R.E. // Biophys. J. 1997. V. 73. P. 1492–1505.
22. Hyslop P.A., Morel B., Sauerheber R.D. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 1025–1038.
23. Evans R.W., Williams M.A., Tinoco J. // Biochem. J. 1987. V. 245. P. 455–462.
24. Braganza L.F., Worcester D.L. // Biochemistry. 1986. V. 25, P. 7484–7488.
25. Patra M., Karttunen M., Hyvonen M.T., Falck E., Lindqvist P., Vattulainen I. // Biophys. J. 2003. V. 84. P. 3636–3645.
26. Evans E., Rawicz W. // Phys. Rev. Lett. 1990, V. 64, P. 2094–2097.
27. Rand R., Parsegian V. // Biochim. et biophys. acta. 1989. V. 998. P. 351–376.
28. Heyse S., Vogel H., Sanger M., Sigrist H. // Protein Sci. 1995. V. 4. P. 2532–2544.
29. Pabst G. // Langmuir. 2000. V. 16. P. 8994–9001.
30. Salamon Z., Lindblom G., Rilfors L., Linde K., Tollin G. // Biophys. J. 2000. V. 78. P. 1400–1412.
31. Feller S., Pastor R.W. // J. Chem. Phys. 1999. V. 111. P. 1281–1287.
32. Dolan E.A., Venable R.M., Pastor R.W., Brooks B.R. // Biophys. J. 2002. V. 82. P. 2317–2325.
33. White S.H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 4048–4050.
34. Pearlman D.A., Case D.A., Caldwell J.C., Seibel G.L., Singh U.C., Weiner P.K., Kollman P.A. Amber 4.0. San Francisco: University of California, 1991.
35. Rog T., Murzyn K., Pasenkiewicz-Gierula M. // Acta Biochim. Polon. 2003. V. 53. P. 789–798.
36. Nagle J.F., Zhang R., Tristram-Nagle S., Sun W.J., Petrache H.I., Suter R.M. // Biophys. J. 1996. V. 70. P. 1419–1431.
37. Wiener M.C., White S.H. // Biophys. J. 1992. V. 61. p. 434–447.
38. Reiter G., Siam M., Falkenhagen D., Gollneritsch W., Baurecht D., Fringeli U.P. // Langmuir. 2002. V. 18. P. 5761–5771.
39. Seelig A., Seelig J. // Biochemistry. 1977. V. 16. P. 45–50.
40. Seelig J., Seelig A. // Q. Rev. Biophys. 1980. V. 13. P. 19–61.
41. Lafleur M., Fine B., Sternin E., Cullis P.R., Bloom M. // Biophys. J. 1989. V. 56. P. 1037–1041.
42. Yau Y.-M., Wimley W.C., Gawrisch K., White S.H. // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 14713–14718.
43. Huster D., Mutter P., Arnold K., Herrmann A. // Biophys. J. 2001. V. 80. P. 822–831.
44. Scheldt H.A., Mutter P., Herrmann A., Huster D. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 45563–45569.
45. Lafleur M., Cullis P.R., Bloom M. // Eur. Biophys. J. 1990. V. 19. P. 55–62.
46. Klose G., Madler B., Schafer H., Schneider K.P. // J. Phys. Chem. B. 1999. V. 103. P. 3022–3029.
47. Schneider M.J., Feller S.E. // J. Phys. Chem. B. 2001. V. 105. P. 1331–1337.
48. Bockmann R.A., Hac A., Heimburg T., Grubmuller H. // Biophys. J. 2003. V. 85. P. 1647–1655.
49. Рабинович А.Л., Рупатту П.О. // Биофизика. 1997. Т. 42. № 1. С. 138–146.
50. Chiu S.W., Jakobsson E., Subramanian Sh., Scott H.L. // Biophys. J. 1999. V. 77. P. 2462–2469.
51. Chiu S.W., Jakobsson E., Scott H.L. // Biophys. J. 2001. V. 80. P. 1104–1114.
52. Tieleman D.P., Berendsen H.J.C. // J. Chem. Phys. 1996. V. 105. P. 4871–4880.
53. Essmann U., Berkowitz M.L. // Biophys. J. 1999. V. 76. P. 2081–2089.
54. Lin J.-H., Baker N.A., McCammon J.A. // Biophys. J. 2002. V. 83. P. 1374–1379.
55. Tieleman D.P., Marrink S.J., Berendsen H.J. // Biochim. et biophys. acta. 1997. V. 1331. P. 235–270.
56. Flewelling R.F., Hubbell W.L. // Biophys. J. 1986. V. 49. P. 541–552.
57. Simon S., McIntosh T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 9263–9267.
58. Gawrisch K., Ruston D., Zimmerberg J., Parsegian V.A., Rand R.P., Fuller N. // Biophys. J. 1992. V. 61. P. 1213–1223.
59. Sackmann E. // Handbook of Biological Physics. V. 1A. Structure and Dynamics of Membranes / Eds. Lipowsky R. and Sackmann E. Amsterdam: Elsevier, 1995. P. 213–304.

60. Pfeiffer W., Henkel T., Sackmann E., Knoll W. Richter D. // *Europhys. Lett.* 1989. V. 8. P. 201–206.
61. Filippov A., Oradd G., Lindblom G. // *Biophys. J.* 2003. V. 84. P. 3079–3086.
62. Kung C.E., Reed J.K. // *Biochem.* 1986. V. 25. P. 6114–6121.
63. Dunham W.R., Sands R.H., Klein S.B., Duelli E.A., Rhodes L.M., Marcelo C.L. // *Spectrochim. Acta A.* 1996. V. 52. P. 1357–1368.
64. Sinensky M. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1974. V. 71. P. 522–525.
65. Sonnleitner A., Schutz G.J., Schmidt Th. // *Biophys. J.* 1999. V. 77. P. 2638–2642.
66. Mahoney M.W., Jorgensen W.L. // *J. Chem. Phys.* 2001. V. 114. P. 363–366.
67. Боголюбов Н.Н. Проблемы динамической теории в статистической физике. М.: Гостехиздат, 1946.

## Molecular Dynamics of a Hydrated Palmitoyloleoylphosphatidylcholine Bilayer in Collisional Thermostat

Ye. V. Tourleigh, K. V. Shaitan, N. K. Balabaev

*Moscow Lomonosov State University, 119992 Moscow*

*\*Institute of Mathematical Problems of Biology, Russian Academy of Sciences 142290, Pushchino, Moscow Region*

Molecular dynamics (MD) of a hydrated palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC) bilayer was investigated in collisional thermostat and Berendsen barostat. Specific superficial area of lipid, distributions of atomic groups along the normal to membrane, radial distribution functions of atoms in the plane of bilayer, order parameter profile, electrostatic potential along the normal to bilayer, lateral self-diffusion coefficient of lipids were calculated. MD protocols were developed such that the obtained data would be in accordance with experimental data and with those of other computer experiments. The problem of unattainability of thermodynamic equilibrium in numeric experiments on systems containing many atoms is discussed. The method of steered dynamics was developed for evaluation of heterogeneous microviscosity of membrane.