

УДК 577.2.08:681.3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА И ДИЗАЙН БИО- И НАНОСТРУКТУР

К.В. ШАЙТАН*, Е.В. ТУРЛЕЙ, Д.Н. ГОЛИК, К.Б. ТЕРЕШКИНА,
О.В. ЛЕВЦОВА, И.В. ФЕДИК, А.К. ШАЙТАН, М.П. КИРПИЧНИКОВ

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

Молекулярная динамика и молекулярное моделирование играют важную роль в построении гипотез, формулировании основных принципов и направлении развития новых материалов. Так, например, в [1] для моделирования рекомендуются четыре области, которые имеют большой потенциал промышленного воздействия в ближайшие годы: новые стратегии моделирования сложных систем и материалов, дизайн новых функциональных материалов *in silico*, компьютерно-ориентированные методы нанотехнологии и моделирование биологических и биомиметических материалов. Методы молекулярной динамики широко применяются при изучении фундаментальных проблем естествознания, а также в прикладных задачах молекулярной биоинженерии, биотехнологии, нанотехнологии, материаловедения и др. [2, 3]. Решение системы большого числа классических уравнений движения для атомных частиц проводится, как правило, с использованием разностной схемы Верле. Силовое поле задается системой парных атом-атомных потенциалов, которые специально калибруются для определенного типа молекулярных объектов (биополимеры, минералы, сплавы и пр.). Обычно используются также специальные алгоритмы для поддержания постоянной температуры и давления (или объема). Применяются варианты как равновесной молекулярной динамики, то есть молекулярной динамики только под воздействием межатомных взаимодействий, так и неравновесной (или управляемой) молекулярной динамики (Steered Molecular Dynamics, [4]) под действием дополнительных силовых воздействий и (или) специальных граничных условий. Использование неравновесной молекулярной динамики в применении к сложным и гетерогенным молекулярным системам

является в настоящее время более перспективным. Это обусловлено принципиальной возможностью целенаправленно планировать вычислительный эксперимент и изучать отклик системы на внешнее воздействие. Однако здесь требуется более совершенное программное обеспечение и дополнительные усилия при интерпретации результатов. В статье кратко рассмотрены некоторые направления использования управляемой молекулярной динамики для исследования достаточно сложных молекулярных систем, развиваемые на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ.

Динамика биомембран. Биологические мембраны в последние годы являются предметом пристального изучения [5–9]. Однако данные по кинетическим свойствам фосфолипидного бислоя с учетом его анизотропии и неоднородности мало доступны. Ниже обсуждается проблема неоднородности и анизотропии фосфолипидного бислоя по отношению к диффузионным процессам. Подробно рассматривается мембрана, состоящая из бислоя 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (ПОФХ), содержащего 64 молекулы липида. Степень сольватации – 44 молекулы воды на молекулу липида. Используется модель воды TIP3P, причем валентные связи и валентные углы в молекулах воды не фиксированы, а определяются соответствующими потенциалами. Поверхностная плотность липидов близка к экспериментальным значениям (62–68, [10–13]).

Расчеты молекулярной динамики (МД) такой системы проводились пакетом PUMA [14], который был специально модифицирован для включения управляющих воздействий [6, 7]. Решение системы классических уравнений движения атомов производилось в силовом поле Amber99 [15]. Использовались периодические граничные условия, столкновительный термостат [14] ($T=300\text{K}$) и баростат Берендсена [16]. Контролировалось достижение локального равновесия системой по флуктуациям объема, давления и температуры [6].

* Автор для переписки:

Шайтан К.В.,

сотрудник МГУ им. М.В. Ломоносова

Москва, Воробьевы горы

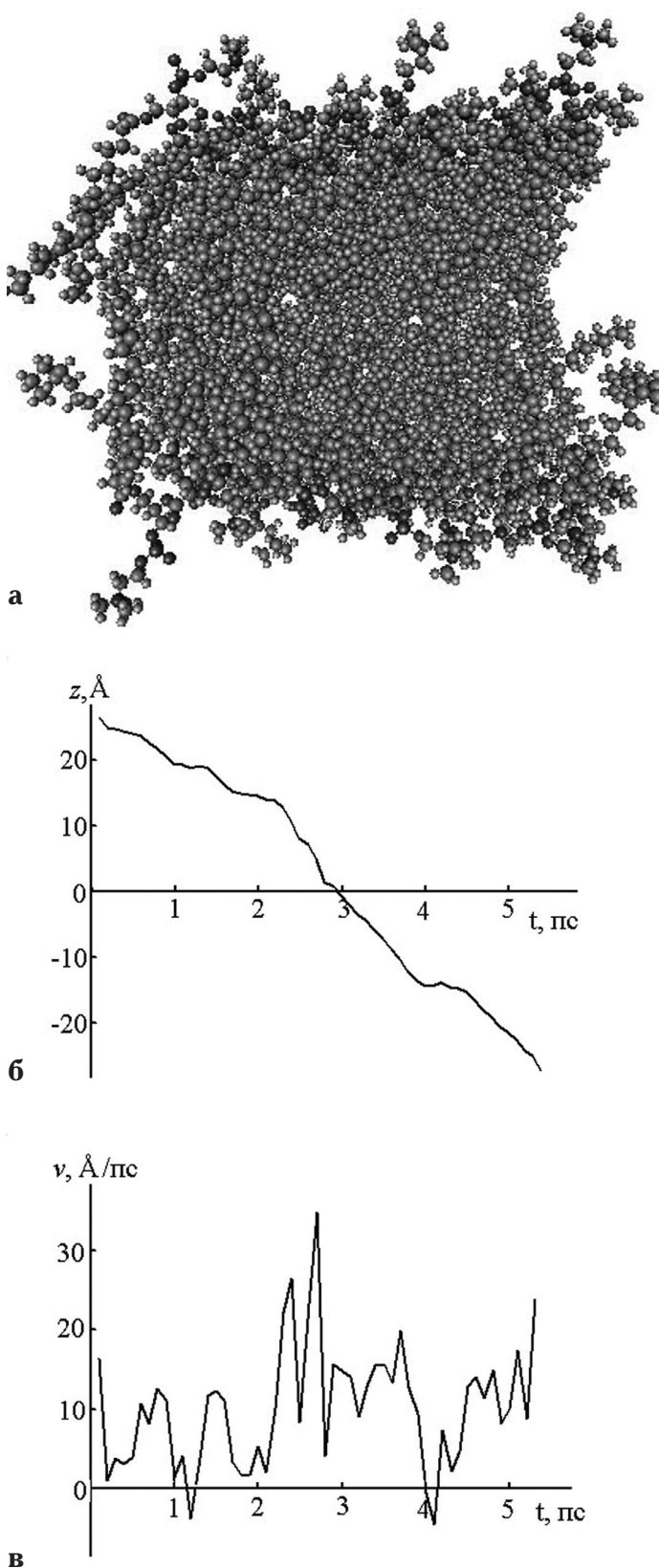


Рис. 1. Структура бислоя ПОФХ (а). Кинетика прохода пробного ван-дер-ваальсовского шара радиуса 2 под действием силы $10 \text{ ккал/моль}^{-1}$ в направлении нормали (б). Положение шара на оси Z (нормали мембраны). Центр бислоя находится при $z=0$, границы — при $z=\pm 20$ (в). Скорость продвижения шара, усреднённая по интервалу 0.1 пс.

Диффузия модельных сфер в биомембране.

Для тестирования свойств системы и вычисления параметров, определяющих диффузию молекул в мембране, использовалась управляемая молекулярная динамика. При этом к некоторым частям системы прилагались дополнительные силы (постоянные или переменные). Использовались пробные шары массой 18 Да с радиусами 2 и 4 (то есть порядка радиуса атома углерода и небольшой функциональной группы, соответственно), взаимодействующие с остальными атомами только посредством сил Ван-дер-Ваальса (константа взаимодействия $= 0,15 \text{ ккал/моль}$), к которым прикладывалась дополнительная постоянная сила F_{ext} , действующая в направлении нормали или плоскости мембраны. В первом случае пробный шар предварительно фиксировался на расстоянии 2 от мембраны, во втором — помещался в центр мембраны, и релаксация системы проводилась в течение 2 пс. Далее прикладывалась сила величиной от $0,3 \text{ ккал/моль}^{-1}$ до 4 ккал/моль^{-1} ($1 \text{ ккал/моль}^{-1} = 7 \cdot 10^{-6} \text{ дин}$). В случае шара с радиусом 2 бралось также значение силы $10 \text{ ккал/моль}^{-1}$ (рис. 1).

Отметим, что на молекулярных масштабах наблюдаются довольно существенные отклонения от гидродинамической формулы Стокса, что вполне естественно, так как приближение сплошной среды для частиц такого размера практически не работает. Соотношение Стокса может использоваться лишь для качественных оценок.

Расчет траекторий SMD в мембранной системе проводился до первого полного прохода ван-дер-ваальсовских шаров через мембрану, но не более чем 2 нс. Шары радиусом 2 при силе $1-10 \text{ ккал/моль}^{-1}$ проникали через мембрану за время, меньшее 2 нс. В остальных случаях шары застревали на поверхности либо успевали погрузиться в мембранный слой только на некоторую глубину. При величине силы менее 1 ккал/моль влияние возмущений среды на шар радиусом 4 было сравнимо с приложенной силой, и в ряде случаев пробная молекула отклонялась от начального положения также и в противоположную от мембраны сторону на расстояния до 2.

При величине силы больше критического значения (например 1 ккал/моль^{-1} для шара радиуса 2) молекула относительно быстро проникает в мембрану. Скорость проникновения при этом определяется, в основном, дрейфом под действием внешней силы, а вклад диффузии крайне мал.

В случае латерально приложенной силы использовались значения $F_{ext} = 1, 2, 4$ и $10 \text{ ккал/моль}^{-1}$. В случае с $F_{ext} = 1 \text{ ккал/моль}^{-1}$ при ана-

лизе кинетических характеристик учитывался 75-пс участок траектории, в течение которого частица оставалась в центре бислоя.

Коэффициент вязкого трения определялся как отношение внешней силы к скорости дрейфа частицы:

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

Формально коэффициент трения можно пересчитать в терминах коэффициента диффузии, пользуясь известным соотношением Эйнштейна и в терминах микровязкости среды с использованием формулы Стокса.

В настоящее время имеются ограниченные данные относительно вязкости при движении частицы по нормали к поверхности мембраны и в латеральном направлении в центре бислоя. Экспериментально известна усредненная величина вязкости поверхностного слоя, составляющая от 30 до 190 сПз для различных липидных мембран [17–19]. Для ПОФХ известна также экспериментальная оценка усредненной вязкости порядка 18 сПз [20]. Поскольку значения микровязкости различны для разных участков мембраны, целесообразно выделить несколько структурных и динамически неоднородных областей мембраны. В первом приближении можно выделить области липидных голов и алкильных цепей. На рисунке 2 приведены графики зависимости коэффициента трения в терминах микровязкости для различных частей системы, полученные при различных значениях внешней силы, действующей на частицу радиуса 2 в направлении нормали к мембране.

Рассчитанные значения эффективной вязкости воды для шара радиуса 2 составляют порядка 0,3–0,4 сПз, что в 2–3 раза меньше экспериментального значения. Эти величины согласуются с известными оценками вязкости воды в модели ТРЗР [21]. Поперечная вязкость мембраны для частиц такого размера не превышает 6 сПз. Вязкость в центральной части бислоя в несколько раз меньше этого значения.

Для латерального смещения шара под действием силы данные представлены на рис. 3. Значения вязкости в данном случае очень близки к значениям вязкости, измеренной в области алкильных хвостов в направлении нормали.

Отметим, что для частиц радиусом 2 формула Стокса в области алкильных хвостов практически не работает. В целом, полученные результаты свидетельствуют о неньютоновском характере среды

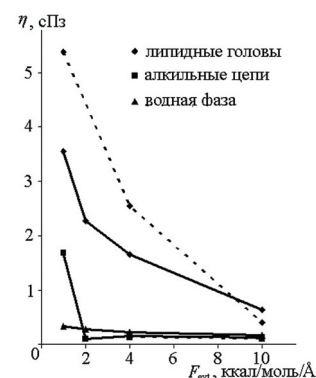


Рис. 2. Вязкость в системе ПОФХ-вода. Радиус пробного ван-дер-ваальсовского шара 2. Сплошной линией отмечены данные для системы после предварительной релаксации системы в течение 500 пс, пунктирной — после окончательной релаксации в течение 1 нс

и слабой неравновесности данной системы при скоростях движения порядка 1–10 /пс.

Скорость проникновения молекулы под действием внешней силы зависит также от химической природы молекулы. Для сравнения была рассчитана динамика проникновения в бислой остатков триптофана (эффективный радиус 4,8), аланина (эффективный радиус 3,1, рис.4) и ван-дер-ваальсовской сферы радиуса 2. Полученные значения вязкости приведены на рисунке 5. В случае многоатомных молекул сила прикладывалась равномерно ко всем атомам системы.

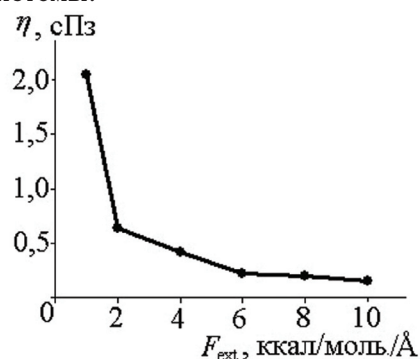


Рис. 3. Вязкость в центре бислоя ПОФХ. Радиус пробной ван-дер-ваальсовского шара 2

Отметим, что более полярный остаток триптофана развивает большую скорость в области липидных голов, чем остаток аланина, поэтому эффективное значение микровязкости для него оказывается ниже. На участке гидрофобных алкильных цепей ситуация обратная, причём разница в скоростях здесь достигает пятнадцати раз. Наиболее чувствительным к природе молекул при прохождении через мембрану оказывается участок голов липидов. Гидрофобная сердцевина бислоя с большим свободным объемом чувствительна к размеру частиц.

Латеральная самодиффузия липидов в бислое.

О коэффициентах латеральной диффузии липидов в мембранах имеется значительно более подробная экспериментальная информация. Эти данные могут быть использованы для тестирования методики динамического моделирования. Коэффициент латеральной

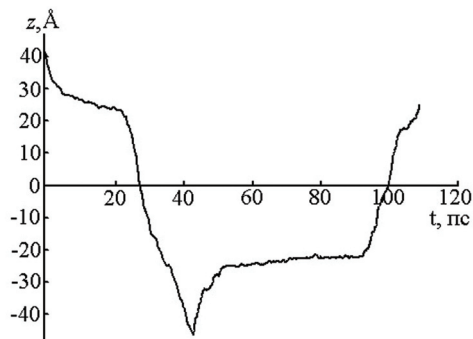


Рис. 4. Динамика прохождения остатка аланина через липидную мембрану. Показано положение геометрического центра остатка. Границы бислоя находятся в положениях ± 22 . В точке излома направление силы было изменено на противоположное



Рис. 5. Зависимость микровязкости от эффективного радиуса пробных молекул в системе ПОФХ-вода. Суммарная сила $F_{\text{ext}} = 10$ ккал/моль \cdot с $^{-1}$

самодиффузии липидов D_{xy} определялся в соответствии с известным соотношением,

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

где в угловых скобках находится квадрат отклонения центра масс липида в плоскости бислоя. Усреднение проводится по всем липидам. Траектория общей длиной 3 нс поделена на 12 участков по 250 пс. Зависимости квадрата смещения (рис. 6) получали в результате усреднения по всем 12 участкам.

Вычисленное для ПОФХ значение $D_{xy} = 2,4 \cdot 10^{-7}$ см 2 /с, что близко к данным по квазиупругому рассеянию нейтронов на бислоях дипальмоилфосфатидилхолина ($1 \cdot 10^{-7}$ см 2 /с [22]) и диолеилфосфатидилхолина ($2 \cdot 10^{-7}$ см 2 /с [23]). Результаты импульсного ЯМР для бислоев ПОФХ дают значения $2,0 \cdot 10^{-7}$ см 2 /с при 298 К и

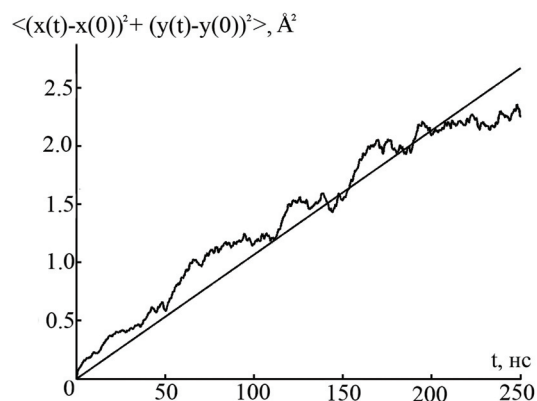


Рис. 6. Средний квадрат смещения центров масс липидов в плоскости бислоя ПОФХ. Прямая — линейная аппроксимация

$2,5 \cdot 10^{-7}$ см 2 /с при 303 К [24], что практически совпадает с полученными здесь значением. Отметим, что полученное значение коэффициента латеральной диффузии оказалось гораздо ближе к экспериментальным значениям, чем коэффициенты, получаемые в МД-расчетах в соответствии с другими методиками (для дипальмоилфосфатидилхолиновых бислоев $3 \pm 0,6 \cdot 10^{-7}$ см 2 /с [25]; $4,0-4,5 \cdot 10^{-7}$ см 2 /с [26] и бислоя ПОФХ $7,3 \cdot 10^{-5}$ см 2 /с [9]).

Оценка гидрофобных свойств аминокислотных остатков на границе вода-мембрана. Рассмотрим пример использования техники введения специальных граничных условий. Методами управляемой молекулярной динамики исследовалось поведение отдельных аминокислотных остатков на границе раздела фаз между водой и неполярным растворителем.

Расчет был произведен как для раздела фаз вода/гексан, так и для модельной системы вода/вакуум. В последнем случае водный слой был отделен от вакуума плоской виртуальной стенкой, задаваемой, как дополнительный отталкивающий потенциал для молекул воды. При этом стенка оставалась проницаемой для молекул аминокислотных остатков. Использовался столкновительный термостат, который оказывал воздействие на молекулу и в том случае, если она находилась в слое вакуума. Таким образом, частично компенсировалось отсутствие гидрофобной среды.

Аминокислотные остатки брались в форме бирадикального мономерного звена, в виде $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R})-\text{CO}-$, то есть как незаряженный мономер с формально ненасыщенными связями. Использовался программный комплекс RUMA. Выбирались периодические граничные условия, силовое поле Amber 99 и модель воды TIP3P с нефиксированными внутренними степенями свободы. Для системы вода/гексан использовался баростат Берендсена вдоль оси пер-

пендикулярной границе раздела фаз. Система вода/вакуум моделировалась в NVT ансамбле, плотность воды соответствовала нормальным условиям.

Для оценки гидрофобных свойств аминокислотных остатков проводилась статистическая обработка траекторий и анализировались пространственные и ориентационные распределения остатков. Ниже проведено сравнение этих двух моделей.

Рассмотрим поведение фенилаланина на границе раздела фаз вода/гексан. На рисунке 7 приведены усредненные по времени профили плотности воды и гексана. Видно, что граница раздела фаз представляет собой переходный слой толщиной около 5 Å. На рисунке 8 приведены распределения для положений центров масс остова и боковой цепи фенилаланина. Максимумы распределений практически точно соответствуют середине межфазного слоя, то есть молекула проявляет поверхностно-активные свойства. При этом графики распределений для гидрофобной боковой цепи и полярного остова смещены в сторону фазы гексана и водной фазы соответственно. Анализ ориентаций молекулы показывает, что боковая цепь преимущественно смещена в сторону гексана. Вектор соединяющих центры масс остова и боковой цепи образует с поверхностью раздела фаз угол в среднем около 30 градусов, то есть молекула как бы лежит на границе раздела.

Рассмотрим далее динамику фенилаланина в системе с виртуальной отталкивающей стенкой. Из рисунка 8 видно, что для системы с отталкивающей стенкой крутизна профиля плотности водной фазы больше, чем в системе вода/гексан. Отсутствие неполярной фазы гексана несущественно меняет форму и ширину распределений для аминокислотного остатка (рис. 10). Однако хорошо заметно смещение наиболее вероятного положения центров масс остова и бокового радикала в сторону водной фазы по сравнению со случаем раздела фаз вода/гексан. Наиболее вероятное положение молекулы при этом находится в приграничном к разделу фаз слое воды, а не на самой границе раздела фаз. Отметим, что динамика ориентации молекулы в системах вода/вакуум и вода/гексан отличается незначительно.

Таким образом, модель искусственной отталкивающей плоскости может использоваться для быстрой оценки гидрофобных и поверхностно-активных свойств молекулярных структур. Эта модель была также использована нами для анализа свойств и классификации гидрофобности

большинства аминокислотных остатков. Оценка параметров гидрофобности используется как для построения профилей гидрофобности белков [27, 28], так и широко применяется в фармакокинетике [29]. Гидрофобность является одним из важнейших параметров для реакций, катализируемых ферментами. Сайты связывания последних весьма восприимчивы к гидрофобным участкам молекул субстрата [30]. При анализе распределений остатки всех основных типов аминокислот в первом приближении разделились на две группы. Первая группа проявляет явные поверхностно-активные свойства. К этой группе относятся все остатки с неполярными боковыми группами, включая глицин. Остатки второй группы десорбировались с поверхности и уходили в водную фазу. К этой группе относятся остатки, боковые группы которых являются либо полярными, либо заряженными. Подчеркнем, что развиваемый подход позволяет разрабатывать систему количественных показателей, характеризующих гидрофобные свойства молекул.

Динамика функционирования ионных каналов. Ионные каналы, сформированные полипептидными структурами, являются достаточно новыми и сложными объектами для молекулярной динамики, и здесь методы управляемой (неравновесной) динамики оказываются наиболее эффективными. Ниже рассмотрены примеры катион (Na^+) проводящего грамицидинового канала и анион (Cl^-) проводящего канала рецептора глицина.

Динамика грамицидинового канала. Грамицидин А - природный антибиотик, активная форма которого является димером. При встраивании в мембрану он образует канал, проводящий протоны и одновалентные катионы по градиенту концентраций, что вызывает понижение мембранного потенциала покоя и сопротивления мембраны [31–33]. Известны две конформации грамицидинового канала в мембране: спиральный димер и двойная спираль [34], которые различаются по стабильности и функциональной активности [35]. Рассматривалась полноатомная структура комплекса фосфолипидного бислоя ПОФХ с грамицидиновым каналом, состоящим из двух молекул грамицидина А в конформации спирального димера. Расчеты проводились с помощью пакета молекулярной динамики Gromacs 3.1.4 (потенциальное поле Gromos-96) [36]. Использовалась стохастическая динамика с параметром 0,02 пс, периодические граничные условия, баростат Берендсена (вдоль оси нормали мембраны поддерживалось давление 1 бар,

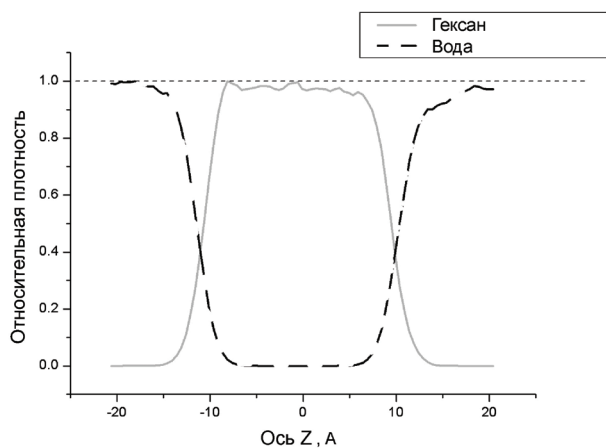


Рис. 7. Профили плотности воды и гексана вдоль оси, перпендикулярной разделу фаз, нормированные к единице, в системе вода/гексан

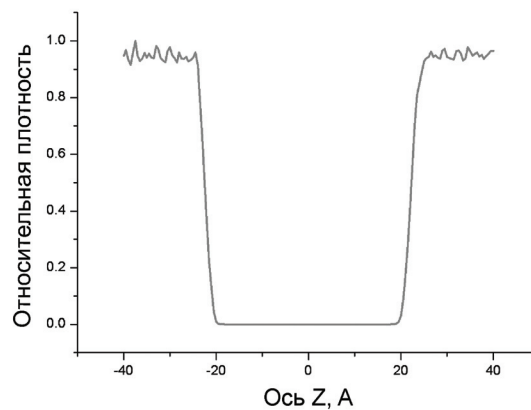


Рис. 9. Профиль плотности воды вдоль оси, перпендикулярной отталкивающей стенке, в системе вода/вакуум

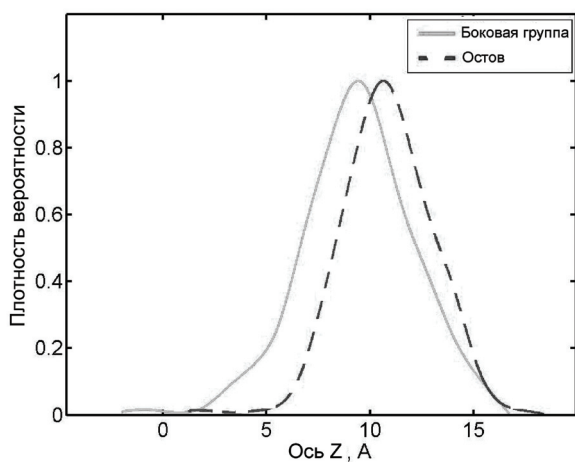


Рис. 8. Графики плотности вероятности для положений центров масс остова и боковой группы аминокислотного остатка в системе вода/гексан

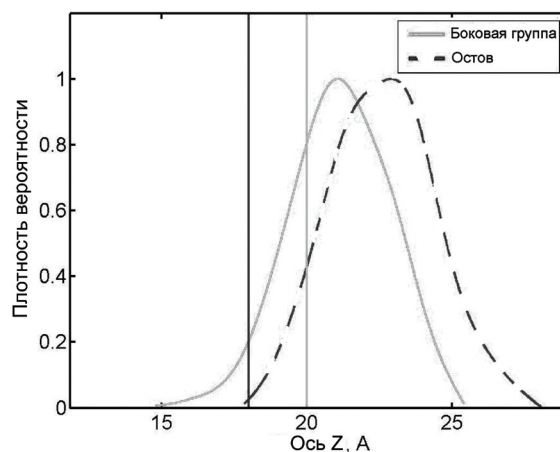


Рис. 10. Графики плотности вероятности для положений центров масс остова и боковой группы аминокислотного остатка в системе вода/вакуум

перпендикулярно нормали -260 бар, коэффициент баростатирования 10 пс), модель воды TIP3P, $T = 300$ К, $\epsilon = 2$. Катион натрия помещался в водную среду на расстоянии 5 над порой канала. Вокруг катиона достаточно быстро формировалась гидратная оболочка из 6 молекул воды. К иону натрия прикладывалось ускорение 25 нм/пс^2 вдоль оси нормали мембраны (эквивалентно силе $13 \text{ ккал/моль} \cdot \text{с}^{-1}$).

Катион натрия при вхождении в полость поры раздвигает атомы полярных головок липидов и молекул грамицидина (рис. 11). На этой стадии происходит замена 6 молекул гидратной оболочки иона натрия в водной среде на 2 молекулы воды в поре канала. Уменьшение скорости движения иона соответствует локальным энергетическим минимумам, связанным с притяжением катиона к отрицательно заряженным

атомам кислорода и отталкиванием от положительно заряженных атомов водорода.

Подвижность или эффективный коэффициент диффузии единичного катиона в канале можно оценить исходя из модели вязкого трения:

$$D(z) = \frac{kT}{\gamma}, \gamma = \frac{F}{v},$$

где $D(z)$ — коэффициент диффузии по оси z , γ — коэффициент трения, F — приложенная внешняя сила, v — средняя скорости прохождения иона через канал.

Эта оценка дает для коэффициента диффузии в грамицидиновом канале значение $0,6 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$, что более чем в 2 раза меньше значения коэффициента диффузии иона в воде TIP3P, полученного тем же методом ($1,5 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$). Отметим, что расчеты, проведенные для

катиона натрия в канале ацетилхолинового рецептора и аниона хлора в канале глицинового рецептора, дают для коэффициентов диффузии близкие значения.

Динамика канала глицинового рецептора.

Глициновые рецепторы относятся к семейству лиганд-зависимых ионных каналов и наряду с рецепторами -аминомасляной кислоты ГАМКА и ГАМКС обеспечивают быструю нейротрансдукцию в различных отделах ЦНС, формируя тормозные синапсы. Все лиганд-зависимые рецепторы имеют пентамерную структуру [37]. Каждая субъединица рецептора (рис. 12а) состоит из четырех -спиралей и содержит четыре трансмембранных домена ТМ1-ТМ4 [38]. Активация глициновых рецепторов, приводящая к открытию хлорных каналов, происходит при связывании глицина, при этом считается, что основную роль в миграции ионов играют домены ТМ2, непосредственно формирующие пору канала (рис.12б) и таким образом являющиеся наиболее важным компо-

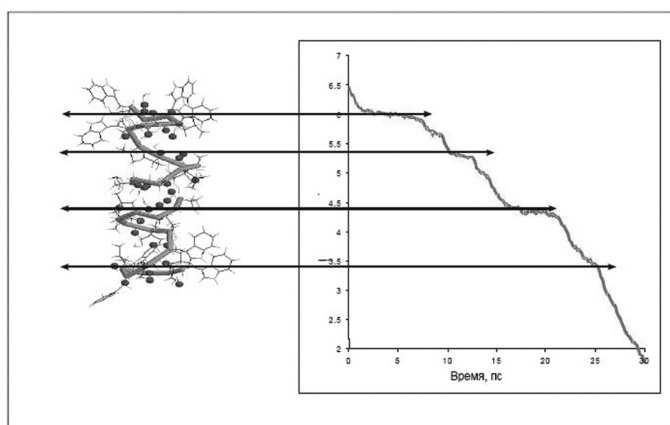


Рис. 11. Динамика прохождения иона Na⁺ через пору канала. Показаны области замедления ионного транспорта за счет взаимодействия с областями локализации частично отрицательно заряженных атомов кислорода основной цепи молекул грамицидина А

нентом с точки зрения функциональной активности рецептора [39, 40]. С мутациями в субъединицах глицинового рецептора связаны некоторые патологии, в частности, рефлекс гиперстраха в ответ на неожиданные раздражения [41].

В работе использовалась модель канала, состоящего из пяти -спиралей ТМ2, подтипа 1 (PDB: 1MOT). Для получения функционально-активного канала был разработан специальный алгоритм, позволяющий получить пентамерный канал, исходя из структуры одной субъединицы. При этом субъединицы были повернуты таким образом, чтобы канал был открыт. Для моделирования взаимодействия с мембраной была предложена модель неразветвленного

углеводородного кольца C₁₅₀H₃₀₀ (рис. 13). Для предотвращения схлопывания канала использовалась специальная процедура усиления энергии невалентных взаимодействий между атомами Leu (Gly-Leu-Gly) и наиболее близкими к ним атомам углерода примерно на порядок по сравнению с обычными значениями для таких пар атомов. Расчеты проводились при T = 300 К в столкновительной среде с массой виртуальных частиц 18 а.е.м. и частотой столкновений 55 пс⁻¹. Использовалась полноатомная модель молекулы, силовое поле Amber99. К иону Cl⁻ прикладывалась постоянная сила 5 ккал/моль ·⁻¹ вдоль оси нормали.

На рис. 14 представлена динамика прохождения иона Cl⁻ сквозь пору глицинового рецептора под действием

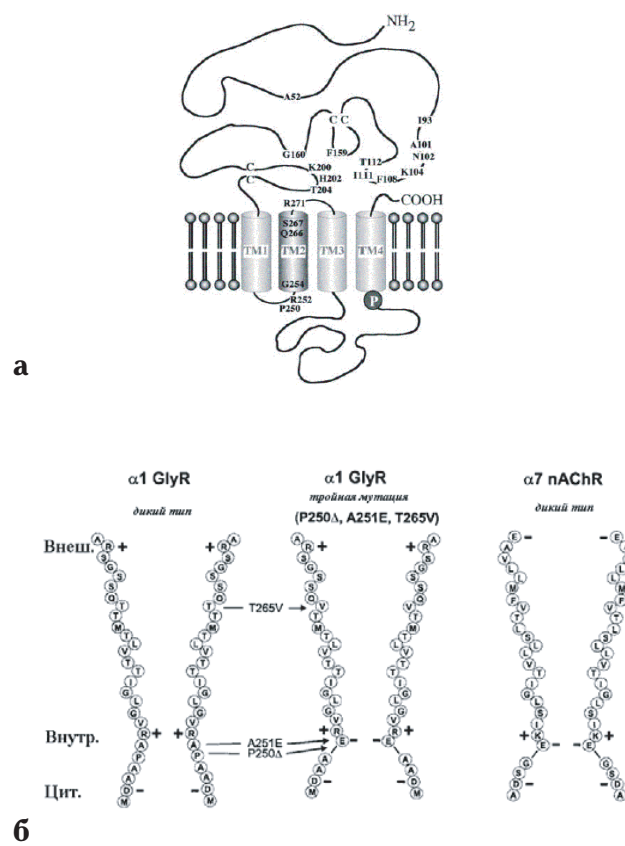


Рис. 12. -субъединица глицинового рецептора. Мембранная топология (а); более темный на рисунке — трансмембранный домен ТМ2, формирующий пору (по [33]). Схематическое представление двух трансмембранных доменов ТМ2 и соответствующих сечений пор гомомерных рецепторов: глицинового рецептора дикого типа и глицинового рецептора с тройной мутацией, из 1-субъединиц, а также никотинового ацетилхолинового рецептора из 7-субъединиц (по [35]) (б)

внешней силы. Как оказалось, в поре глицинового рецептора существует два основных минимума энергии для отрицательных ионов. Оба минимума соответствуют положительным аргининовым кольцам внутри канала

(см. рисунке 12б). Значение эффективного коэффициента диффузии иона Cl^- колеблется в пределах $1,38 \cdot 10^{-5}$ - $1,45 \cdot 10^{-6}$ $\text{см}^2/\text{с}$ в различных частях канала. В варианте равновесной динамики выявляется также дополнительный минимум энергии в поре канала, образованный положительно заряженными атомами бокового радикала Met.

Взаимодействие углеродной нанотрубки с фосфолипидным бислоем. Наноструктуры и их комплексы с биологическими макромолекулярными структурами являются новым полем для применения методов неравновесной молекулярной динамики. В работе [42] рассматривался, в частности, процесс спонтанного встраивания модельной нанотрубки в фосфолипидный бислой с использованием крупномодульного (coarse-grain) приближения. Однако до сих пор практически нет публикаций по динамике взаимодействия биомембран с углеродными нанотрубками в полноатомном приближении.

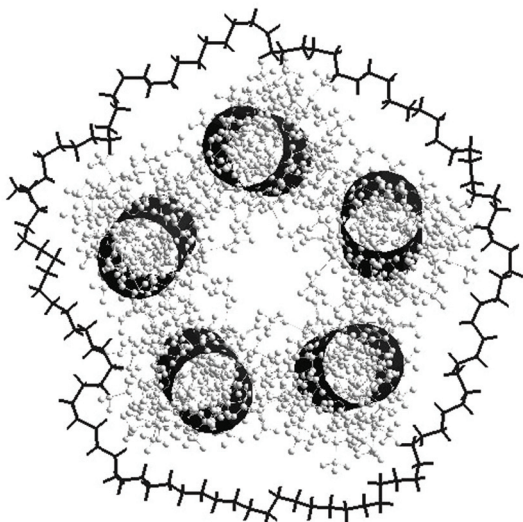


Рис. 13. Канал, стабилизированный углеводородным кольцом

В настоящей работе изучалась динамика проникновения углеродной нанотрубки диаметром 13,5 и длиной 32 через гидратированный бислой ПОФХ под действием внешней силы. Нанотрубка ориентировалась нормально к плоскости мембраны. К атомам углеродной нанотрубки равномерно прилагалась сила в направлении нормали. Результирующее давление составляло порядка $7 \cdot 10^4$ бар (для сравнения отметим, что давление детонации тротила существенно выше и порядка $2 \cdot 10^5$ бар). При таком давлении нанотрубка проходит через фосфолипидный бислой за время порядка 200 пс (рис. 15), выталкивая из бислоя две молекулы фосфолипида.

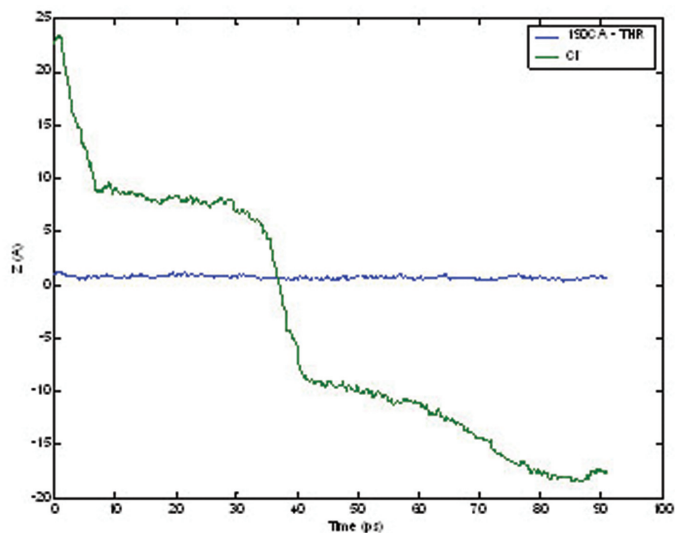


Рис. 14. Динамика прохождения иона Cl^- через пору канала. Внешняя сила 5 ккал/моль. Для сравнения показана динамика атома углерода основной цепи одной из субъединиц

Взаимодействие полипептида с углеродной нанотрубкой. Методы молекулярной динамики позволяют прогнозировать поведение новых молекулярных систем, перспективность использования которых экспериментально пока не изучалась. Одним из важнейших направлений исследований в этой области является взаимодействие нанотрубок с биологическими молекулами. Уже в ближайшее время подобные системы могут вызвать и большой практический интерес в связи с проблемой селективной доставки лекарств в клетки. Так, в работе [43] проводится расчет проникновения одностороннего ДНК-олигонуклеотида в нанотрубку в водной среде. Авторы работы [44] рассматривают прохождение РНК под действием приложенной силы через отверстия в коротких нанотрубках, организованных в монослой. В [45] изучалась адсорбция амилозы на нанотрубке в водной среде и ее проникновение внутрь.

В наших численных экспериментах обнаружено явление самосборки полиаланина и углеродной нанотрубки с образованием структуры в виде спирали полиаланина внутри нанотрубки.

При 300 К за время порядка 200 пс происходит адсорбция (рис. 16) полипептида в альфа-спиральной конформации на поверхности нанотрубки (исходное положение пептида на расстоянии 30 от нанотрубки).

Дальнейшая эволюция комплекса может быть прослежена с использованием метода ускорения надбарьерных переходов путем повышения температуры. При этом наблюдается процесс спонтанного проникновения полиаланина в нанотрубку. Несмотря на то что вы-

игрыш в энергии в этом случае значительно больше, чем при адсорбции пептида на внешней поверхности, переход пептида из состояния снаружи нанотрубки в состояние внутри нанотрубки связан с преодолением определенного энергетического барьера, т.к. энергия адсорбции полипептида уменьшается при смещении пептида к краю нанотрубки.

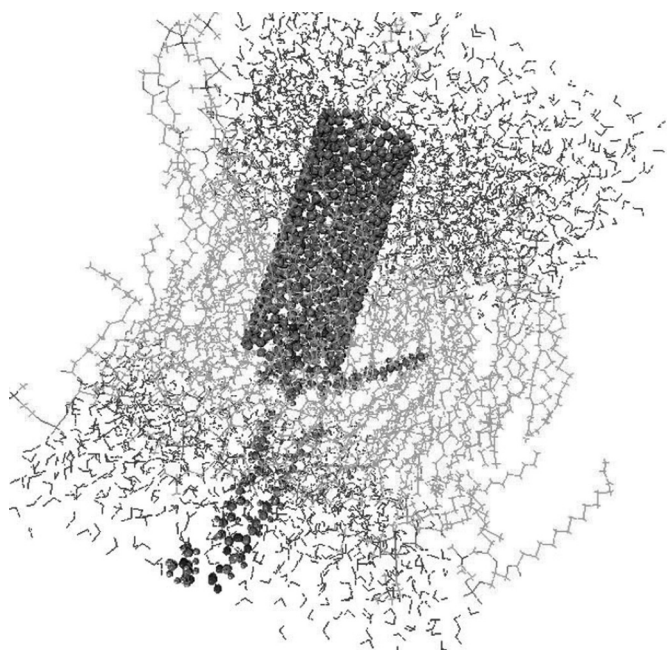


Рис.15. Углеродная нанотрубка протыкает фосфолипидный бислой. Молекулы ПОФХ, выталкиваемые из слоя, изображены более подробно

На рисунке 17 приведена детальная картина акта самосборки обсуждаемой структуры. Находясь на внешней стенке нанотрубки, пептид подавляющую часть времени проводит около ее центральной части. Изредка один из концов пептида оказывается около отверстия. Вследствие флуктуаций происходит перемещение пептида вдоль нанотрубки на такое расстояние, когда большая часть атомов не соприкасается с поверхностью трубки. Затем конец пептида притягивается к отверстию, после чего весь пептид быстро проникает в нанотрубку. Эта стадия при 1000 К занимает 130 пс. При 2000 К самосборка идет по такому же механизму, однако при повышении температуры процесс становится более обратимым, и за счет этого время от начала до завершения акта встраивания увеличивается до 300 пс.

Время формирования активной для самосборки конфигурации при 1000 К составило 4,64 нс, при 2000 К - 0,655 нс. Это дает оценку величины энергии активации порядка 7,8 ккал/моль. Ожидаемое время самосборки при 300 К составляет в этом случае 43

мкс. Отметим, что рассматриваемый процесс моделировался в вакууме. В органических растворителях энергия активации самосборки должна быть ниже за счет влияния энергии сольватации полипептида и нанотрубки.

Динамика функциональных наноструктур.
Наношприц. Рассмотренный выше комплекс полипептида и нанотрубки с закрытым концом может быть, в принципе, использован для доставки пептида (или иной молекулы) через биологическую мембра-

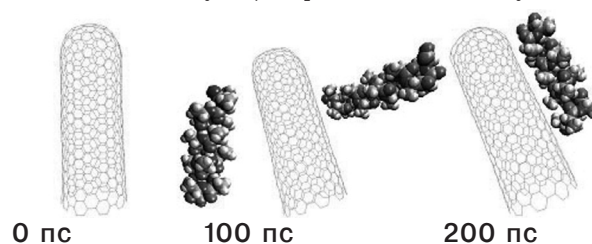


Рис. 16. Последовательные стадии прилипания полиаланина к внешней поверхности нанотрубки

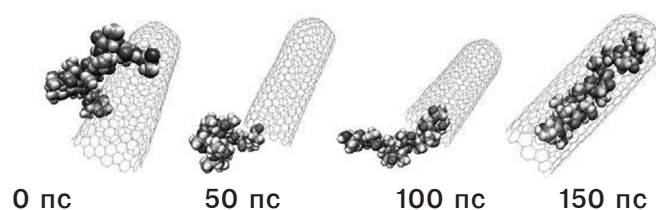


Рис. 17. Последовательные стадии самосборки комплекса пептида и нанотрубки при 1000 К

ну в клетку или отдельный компартмент. Зачастую требуется селективная доставка низкомолекулярных синтетических молекул, которые имитируют работу природных биологических макромолекул и имеют терапевтический потенциал, который сочетается с практичностью при широкомасштабном производстве биофармацевтических веществ. Эти конструкции могут быть также использованы и для изучения механизмов молекулярного распознавания [46].

Отметим, что создание таких систем может породить в ближайшее время новое направление — нанофармакологию. Молекулярная динамика в данном случае выступает как инструмент проектирования функциональной молекулярной конструкции, позволяя определить необходимые параметры устройства. В качестве примера нами был смоделирован наношприц, использующий акт выталкивания пептида из нанотрубки в бислойную мембрану и в воду.

В качестве действующего агента, выталкивающего полиаланин из нанотрубки, брались восемь расширяющихся ван-дер-ваальсовых сфер. Увеличение

радиуса сфер происходило со скоростями 0,25 и 0,5/пс (время расширения 26 или 13 пс, соответственно) до значений радиуса порядка радиуса нанотрубки. Это создавало практически «нановзрыв, и система срабатывала как «нанопушка. На рисунке 18 и 19 приведен сценарий выброса пептида при таких экстремальных параметрах «выстрела» с максимумом давления в нанотрубке порядка 10^5 бар. В момент «выстрела» нанотрубка несколько

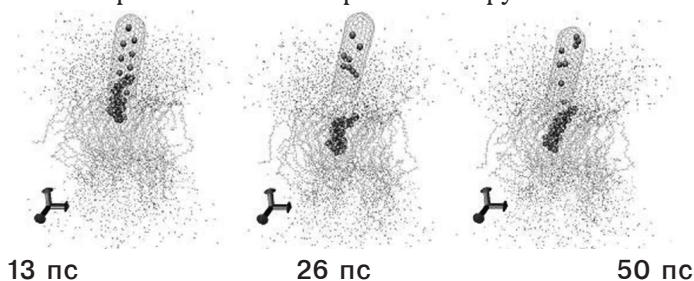


Рис. 18. Последовательные стадии выталкивания пептида в мембрану

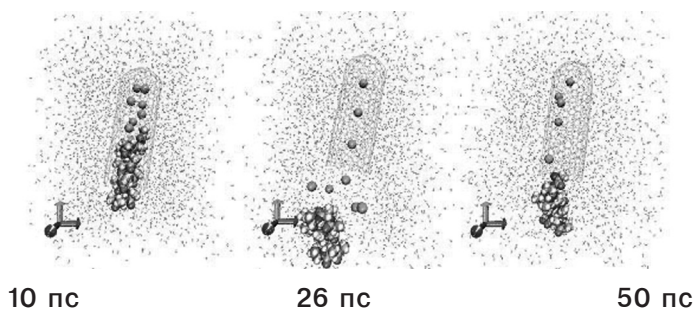


Рис. 19. Последовательные стадии выталкивания пептида в воду

деформируется, но эти деформации не выходят за пределы ее прочности. По окончании процесса выталкивания пептида нанотрубка полностью восстанавливает первоначальную конформацию за время порядка 3 пс.

Полиаланин испытывает конформационные изменения в ходе рассматриваемого процесса. Начальная спиральная конформация наиболее сильно деформируется при выбросе полипептида в вакуум и менее всего - в мембрану. По-видимому, среда играет в этом процессе демпфирующую и структурирующую роль. На рис. 20 видно также, что при уменьшении скорости «нановзрыва» конформационные изменения полипептида обычно уменьшаются. Небольшое уширение распределения по конформациям при выбросе полиаланина в воду может быть связано с дополнительным напряжением, возникающим при входе гидрофобной молекулы в водную среду.

Фолдинг модельных полимерных структур. Методами молекулярной динамики исследовано сворачивание (фолдинг) относительно простой модели полимера. Закономерности формирования пространственной

структуры полимеров и биополимеров в настоящее время остаются малоизученными, несмотря на их важнейшую роль при функционировании биологических систем [47, 48]. Отметим, что специфическое сворачивание характерно даже для обычной свободно-сочлененной цепочки с включенными ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями между звеньями [49–51]. Проводились вычислительные эксперименты по сворачиванию гомополимерной цепочки [52]. Взаимодействия соседних атомов определялось потенциалом валентной связи. Взаимодействия атомов (звеньев цепи), разделенных двумя и более валентными связями, описывалось потенциалом Леннарда-Джонса. В качестве возникающих структур наблюдались всевозможные слои, правые и левые спирали, двойные спирали, шпильки, а также структуры, состоящие из свернутых петель. В системе из двух взаимодействующих полимерных цепей могут образовываться двойные спирали, причем то, каким образом цепи будут взаимно ориентированы в конечной структуре, также зависит от начальной конфигурации системы [52].

Рассматривалась также динамика сворачивания при взаимодействии со вспомогательными структурами, которые позволяли формировать строго определенные упорядоченные структуры независимо от начальной конфигурации полимера. Следует отметить, что в биологических системах молекулярные комплексы, способствующие специфическому сворачиванию, часто имеют форму трубки (шаперонины группы Hsp60, мембранные каналы) [53–55].

Был рассмотрен рефолдинг полимерной глобулы в спираль при специфическом взаимодействии полимера с модельной нанотрубкой. Полимерная цепочка, проходя через нанотрубку, разворачивается, а затем формирует новую упорядоченную структуру (рис. 21). Модельное устройство функционирует при определенном строении поверхности потенциальной энергии для взаимодействия нанотрубки с цепочкой. Устройство этой поверхности иллюстрируется сечениями, изображенными на рисунке 22.

Энергетическая поверхность системы в этом случае образует своего рода ущелье, которое расширяется и становится не таким глубоким ближе к выходу из нанотрубки.

Сходство ряда конечных упорядоченных структур с основными элементами вторичной структуры белков и нуклеиновых кислот в рассмотренных простых примерах обусловлено, по-видимому, тем, что существенная роль в формировании конечной структуры макромолекул принадлежит грубому рельефу энергетической поверхности, который определяется соотношениями между геометрическими параметрами различных типов взаимодействий.

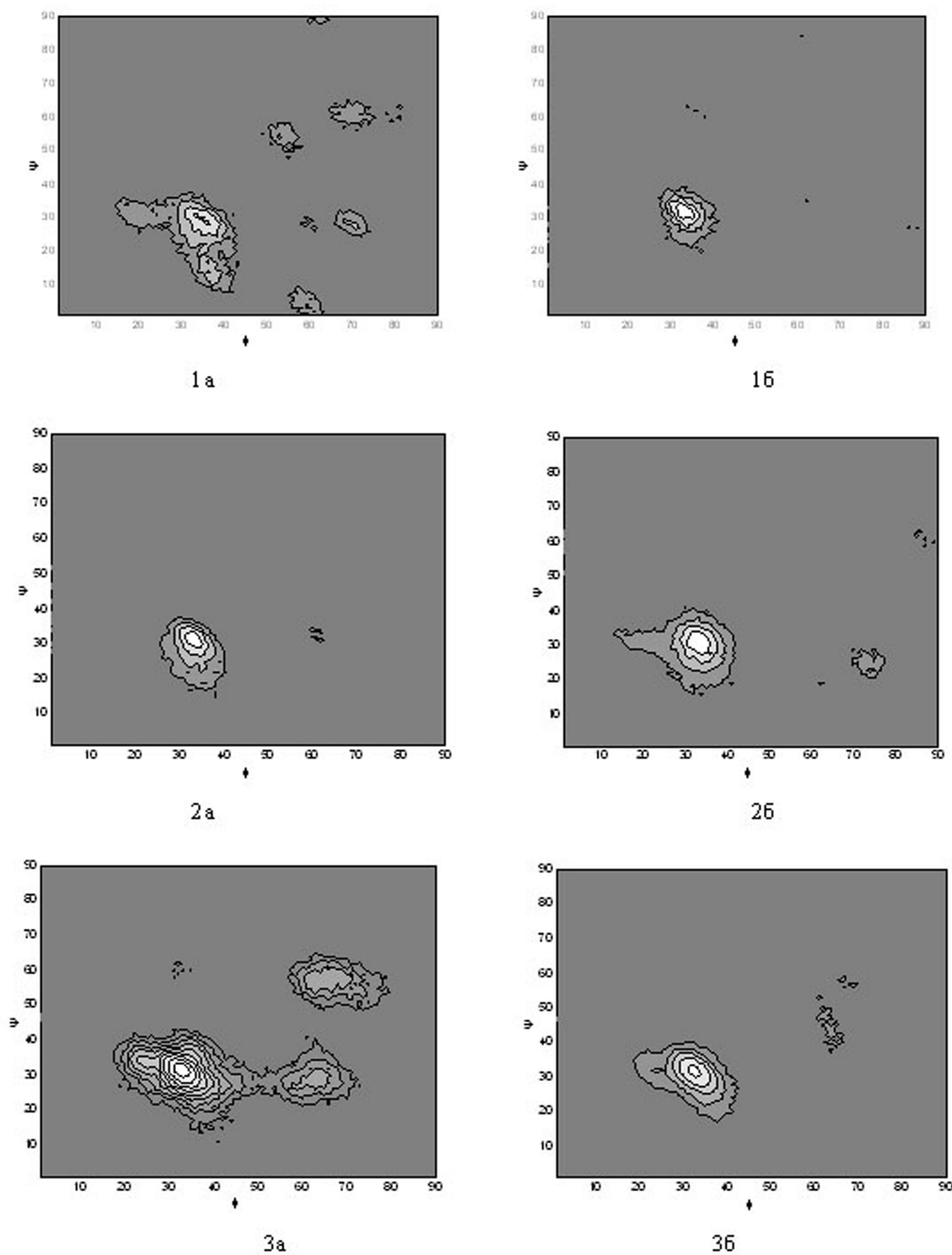


Рис. 20. Сечения Пуанкаре для полиаланина по углам ψ и основной цепи при выталкивании в мембрану (1), воду (2) и вакуум (3) с расширением выталкивающих сфер за времена 13 (а) и 26 пс (б).

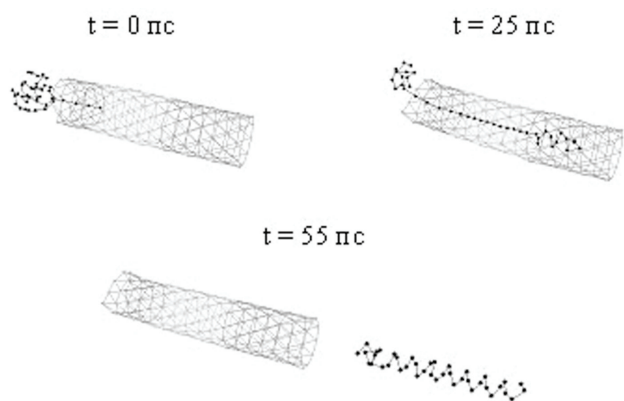


Рис. 21. Рефолдинг полимерной цепочки при взаимодействии с модельной нанотрубкой

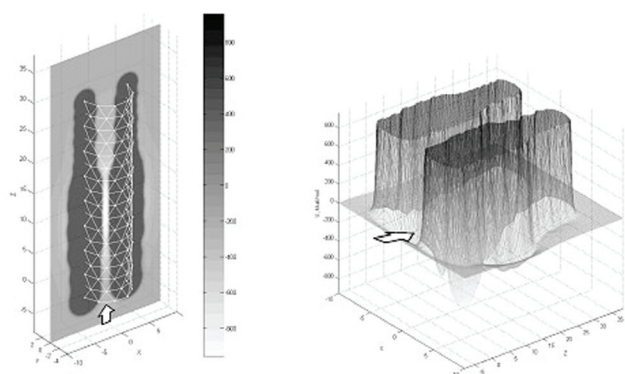


Рис. 22. Трехмерное сечение гиперповерхности потенциальной энергии взаимодействия нанотрубки с цепочкой, проходящее через ось нанотрубки

Заключение. Неравновесная (или управляемая) молекулярная динамика оказывается полезным инструментом для получения детальной и экспериментально трудно доступной информации о структуре, динамических и кинетических свойствах неоднородных и анизотропных систем типа биомембран, биополимеров, комплексов нанотрубок с биополимерами и в других, в том числе и достаточно экзотических в настоящее время, случаях. Здесь очень важны два момента. Во-первых, в рамках этого метода мы принципиально отказываемся от термодинамически равновесных траекторий. То есть не требуем достижения системой полного равновесия и отказываемся от изучения процессов только в рамках анализа равновесных термодинамических флуктуаций. Для систем содержащих более 1000 частиц такой способ мало продуктивен. Во-вторых, в рамках развиваемого неравновесного подхода осуществляется контроль над локальным равновесием по наиболее значимым параметрам (флуктуации объема, давления, температуры). Далее, на этом фоне разыгрывается сценарий молекулярного процесса, стимулированного внешним воздействием

или специальным граничным условием. Имеющиеся данные показывают, что данный метод оказывается весьма полезным для прогноза структурных и функциональных свойств широкого класса молекулярных с линейным масштабом до нескольких нанометров.

Благодарность. Авторы признательны Российскому фонду фундаментальных исследований (грант 04-04-49645), Минобрнауки РФ, Роснауке и Правительству Москвы за финансовую поддержку проводимых научных исследований.

Литература.

1. Gao H. Modelling strategies for nano- and biomaterials. In European white book on fundamental research in materials science. // Van der Woorde M.H. et al. (eds.). Max Planck Gesellschaft. — 2001. — P. 144–148.
2. Frenkel D., Smit B. Understanding molecular simulation: from algorithms to applications, 2nd ed. — Academic Press, San Diego, 2002.
3. Шайтан К.В., Терешкина К.Б. Молекулярная динамика белков и пептидов (методическое пособие) — М.: Ойкос, 2004. — 103 с.
4. Park S., Schulten K. // J. Chem. Phys. — 2004. — Vol. 120. — P. 5946–5961.
5. Chizmadzhev Y.A. // Bioelectrochem. — 2004. — Vol. 63. — P. 129–136.
6. Турлей Е.В., Шайтан К.В., Балабаев Н.К. // Биол. мембраны. — В печати.
7. Турлей Е.В., Шайтан К.В., Балабаев Н.К. // Биофизика. — В печати.
8. Rabinovich A.L., Balabaev N.K., Alinchenko M.G., Voloshin V.P., Medvedev N.N., Jedlovsky P. // J. Chem. Phys. — 2005. — Vol. 122. — P. 84906.
9. Heller H., Schaefer M., Schulten K. // J. Phys. Chem. — 1993. — Vol. 97. — P. 8343–8360.
10. Pabst G., Rappolt M., Amenitsch H., Laggner P. // Phys. Rev. — E. — 2000. — Vol. 62. — P. 4000–4009.
11. Israilewitz B., Gao M., Schulten K. // Curr. Opin. Struct. Biol. — 2001. — Vol. 11. — P. 224–230.
12. Smaby J.M., Mornsen M.M., Brockman H.L., Brown R.E. // Biophys. J. — 1997. — Vol. 73. — P. 1492–1505.
13. Hyslop P.A., Morel B., Sauerheber R.D. // Biochem. — 1990. — Vol. 29. — P. 1025–1038.
14. Lemak A.S., Balabaev N.K. // Mol. Simul. — 1995. — Vol. 15. — P. 223–231.
15. Wang J., Cieplak P., Kollman P.A. // J. Comp. Chem. — 2000. — Vol. 21. — P. 1049–1074.
16. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R. // J. Chem. Phys. — 1984. — Vol. 81. — P. 3684–3690.

17. Nagle J.F., Zhang R., Tristram-Nagle S., Sun W.J., Petrache H.I., Suter R.M. // *Biophys. J.* — 1996. — Vol. 70. — P. 1419–1431.
18. Wiener M.C., White S.H. // *Biophys. J.* — 1992. — Vol. 61. — P. 434–447.
19. Reiter G., Siam M., Falkenhagen D., Gollneritsch W., Baurecht D., Fringeli U.P. // *Langmuir.* — 2002. — Vol. 18. — P. 5761–5771.
20. Seelig A., Seelig J. // *Biochem.* — 1977. — Vol. 16. — P. 45–50.
21. Seelig J., Seelig A. // *Q. Rev. Biophys.* — 1980. — Vol. 13. — P. 19–61.
22. Sackmann E. In *Handbook of Biological Physics*, Vol. 1, Structure and Dynamics of Membranes. — Eds. Lipowsky R. and Sackmann E. Elsevier Sci. Pubs. B.V., Amsterdam, 1995. — P. 213–304.
23. Pfeiffer W., Henkel T., Sackmann E., Knoll W., Richter D. // *Europhys. Lett.* — 1989. — Vol. 8. — P. 201–206.
24. Filippov A., Oradd G., Lindblom G. // *Biophys. J.* — 2003. — Vol. 84. — P. 3079–3086.
25. Essmann U., Berkowitz M.L. // *Biophys. J.* — 1999. — Vol. 76. — P. 2081–2089.
26. R g T., Murzyn K., Pasenkiewicz-Gierula M. // *Acta Biochim. Polon.* — 2003. — Vol. 53. — P. 789–798.
27. Kyte J., Doolittle R.F. // *J. Mol. Biol.* — 1982. — Vol. 157. — P. 105–142.
28. Hopp T.P., and Woods K.R. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1981. — Vol. 78. — P. 3824–3828.
29. Sotomatsu-Niwa T., Ogino A. // *J. Mol. Struct. (Theochem).* — 1997. — Vol. 392 — P. 43–54.
30. Stryer, L. *Biochemistry*, 4th ed. — W.H. Freeman & Co., NY, 1995. — Part I. — Chapter 1.
31. Doebler J.A. // *Cell Biol. Toxicol.* — 1999. — Vol. 15. — P. 279–289.
32. Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Antonenko Y.N. // *Biophys. J.* — 2002. — Vol. 82. — P. 865–873.
33. Williams R.J.P. // *J. Theor. Biol.* — 2002. — Vol. 219. — P. 389–396.
34. Pascal S.M., Cross T.A. // *J. Mol. Biol.* — 1994. — V. 241. — P. 431–439.
35. Groot B.L., Tieleman D.P., Pohl P., Grubmuller H. // *Biophys. J.* — 2002. — Vol. 82. — P. 2934–2942.
36. Lindahl, E., Hess, B., van der Spoel, D. // *J. Mol. Mod.* — 2001. — Vol. 7. — P. 306–317.
37. Langosch D., Thomas L., and Betz H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1988. — Vol. 85. — P. 7394–7398.
38. Legendre P. // *Cell. Mol. Life Sciences.* — 2001. — Vol. 58, — P.760–793.
39. Yushmanov V. E., Mandal P. K., Liu Z., Tang P., Xu Y. // *Biochem.* — 2003. — Vol. 42 — P. 3989–3995.
40. Keramidis A., Moorhouse A.J., French C.R., Schofield P.R., Barry P.H. // *Biophys J.* — 2000. — Vol. 79 — P. 247–259.
41. Jentsch T. J., V. Stein, F. Weinreich, Zdebik A. A. // *Physiol. Rev.* — 2002. — Vol. 82 — P. 503–568.
42. C. F. Lopez, S. O. Nielsen, P. B. Moore, M. L. Klein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101. — P. 4431–4434.
43. Gao H., Kong Y., Cui D., Ozkan C. S. // *Nano Letters.* — 2003. — Vol. 3. — P. 471–473.
44. Yeh I.-C., Hummer G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101. — P. 12177–12182.
45. Xie Y.H., Soh A.K. // *Materials Letters.* — 2005. — Vol. 59. — P. 971–975.
46. Li R., Dowd V., Stewart D.J., Burton S.J., Lowe C.R. Design, synthesis, and application of a Protein A mimetic. — *Nat. Biotech.*, 1998. — Vol. 16. — P. 190–195.
47. Fersht A. *Enzyme structure and mechanism*, 2nd ed. — W.H. Freeman & Co., NY, 1985.
48. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. *Физика белка.* — М.: Книжный дом “Университет», 2002. — 376 с.
49. Khalatur P.G., Novikov V.V., Khokhlov A.R. // *Phys. Rev.* — E. — 2003. — Vol. 67. — P. 051901.
50. Ivanov V.A., Chertovich A.V., Lazutin A.A., Shusharina N.P., Khalatur P.G., Khokhlov A.R. // *Macromol. Symp.* — 1999. — Vol. 146. — P. 259.
51. Chertovich A.V., Ivanov V.A., Zavin B.G., Khokhlov A.R. // *Macromol. Theory Simul.* — 2002. — Vol. 11. — P. 751.
52. Шайтан К.В., Турлей Е.В., Голик Д.Н., Терешкина К.Б., Левцова О.В., Федик И.В., Шайтан А.К., Кирпичников М.П. // *Хим. физика.* — В печати.
53. Koronakis V. // *FEBS Lett.* 2003. — Vol. 555. — P. 66–71.
54. Levitt M. // *Ann. Rev. Biochem.* — 1997. — Vol. 66. — P. 549–579.
55. Miranker A.D., Dobson C.M. // *Curr. Opin. Struc. Biol.* — 1996. — Vol. 6. — P. 31–42.