

Министерство образования и науки Российской Федерации



Евразийская студенческая Ассоциация
Российский Союз студентов
Молодежный Совет МГУ



Вестник молодых ученых

Выпуск I



Сборник лучших докладов
Международной научной конференции
студентов, аспирантов и молодых учёных
«ЛОМОНОСОВ – 2004»

Москва
2004

3. Kalinina O.V., Novichkov P.S., Mironov A.A., Gelfand M.S., Rakhmaninova A.B. // Nucl Acids Res (in press), <http://belozersky.msu.ru/~psn>.
4. Transport Protein Database, TC-DB <http://tcdb.ucsd.edu/tcdb/tcfamilybrowse.php?tcname=1.A.8#description>.
5. Zardoya R., Villalba S. (2001) // J Mol Evol, 52, pp. 391–404.
- [6] Savage D.F., Egea P.F., Robles-Colmenares Y., O'Connell J.D., Stroud R.M. (2003) // PLoS Biol, 1(3), pp. 334–340.
- [7] Fu D., Libson A., Miercke, L.J., Weitzman C., Nollert P., Krucinski J., Stroud R.M. (2000) // Science, 290, pp. 481–486.
- [8] Sui H., Han B.G., Lee J.K., Walian P., Jap B.K. (2001) // Nature, 414, pp. 872–878.
- [9] Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J.B., Engel A., Fujiyoshi Y. (2000) // Nature, 407, pp. 599–605.
- [10] Hannenhalli S.S., Russell R.B. (2000) // J Mol Biol, 303, pp. 61–76.
- [11] Mirny L.A., Gelfand M.S. (2002) // J Mol Biol, 321, pp. 7–20.
- [12] Gaucher E.A., Gu X., Miyamoto M.M., Benner S.A. (2002) // Trends Biochem Sci, 27(6), pp. 315–321.
- [13] EBI MSD Macromolecule File Server <http://pqs.ebi.ac.uk/>

**ДИНАМИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ
ПОЛНОСТЬЮ ГИДРАТИРОВАННОГО ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ
И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА ТРАНСМЕМБРАННОЙ
ДИФФУЗИИ⁴**

Е.В. Турлей, К.В. Шайтан

Биологический факультет

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

E-mail: yegr@moldyn.ru, shaitan@moldyn.ru

Аннотация

Сверхгидратированный бислой ПОФХ моделировался при 300 К. Наиболее важные параметры бислоя, включая распределение массовой плотности, находятся в соответствии с экспериментальными данными. Рассмотрение структурной и динамической гетерогенности мембраны привело к идее «компьютерного вискозиметра». С помощью метода управляемой молекулярной динамики (SMD) была измерена эффективная вязкость среды и динамика трансмембранной диффузии.

Исследование больших биомолекулярных систем требует тщательного анализа. Первой ступенью на пути к реализации новых разработок в области биоинженерного конструирования могут стать исследования *in silico* — компьютерное моделирование на атомном уровне. На примере липидной модельной мембраны исследованы возможности метода молекулярной динамики при изучении процессов мембранного транспорта и их связь с физико-химическими параметрами мембраны.

Расчёты молекулярной динамики (МД) проводились пакетом PUMA [1]. Решение системы классических уравнений движения атомов производилось в силовом поле Amber99 [2].

Мембрана состояла из бислоя 64 молекул 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина (ПОФХ, рис. 1а), одного из наиболее распространённых биоллипидов. Начальная структура соответствовала перпендикулярному положению оси наибольшей протяжённости молекул относительно плоскости мембраны. Поверхностная плотность липидов поддерживалась на уровне порядка 64 \AA^2 , что близко к экспериментальным значениям [3, 4].

⁴ Авторы выражают признательность за поддержку РФФИ (грант №04-04-49645) и Министерству образования РФ (программа «Интеграция»).

Параметры для двойной связи в олеиновом остатке, парциальные заряды в ПОФХ (рис. 1б) взяты из [5]. Использовалась модель воды ТРЗР. Валентные связи и валентные углы в молекулах воды не фиксировались. Молекулы воды в стартовой конфигурации помещались на расстоянии не менее 2,3 Å от мембраны. На молекулу липида приходилось 44 молекулы воды.

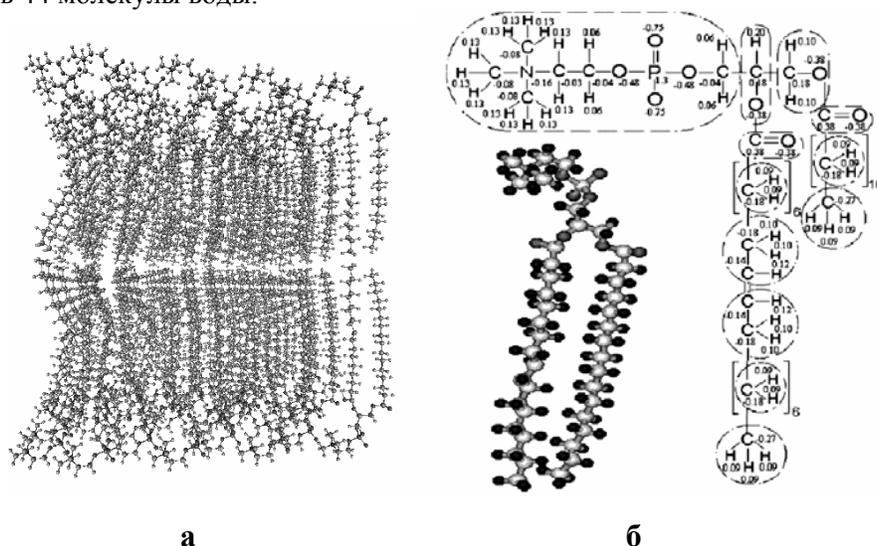


Рис. 1. А. Бислой ПОФХ. Б. Молекула ПОФХ и распределение зарядов в ней
Примечание: выделены электронейтральные группы.

Радиус обрезания для электростатических взаимодействий брался 16 Å. Для ван-дер-ваальсовских взаимодействий проводилось гладкое обрезание с радиусом 15–16 Å. Диэлектрическая проницаемость бралась равной 1. Шаг интегрирования 1 фс.

На систему накладывались периодические граничные условия. При этом размеры ячейки варьируются в зависимости от давления (NPT-ансамбль). Баростатирование осуществлялось в баростате Берендсена с одинаковой для всех трёх направлений частотой 1 пс⁻¹. С учётом эффектов поверхностного натяжения в бислое латеральное давление баростата было взято отрицательным.

Для поддержания постоянной температуры 300 К использовалась виртуальная столкновительная среда (столкновительный термостат). Средняя частота столкновений с виртуальными частицами с массой 18 а.е.м. бралась равной 1 пс⁻¹.

Бислой ПОФХ подвергался многоступенчатой релаксации. Предварительная релаксация бислоя в условиях изотропного баростатирования при давлении 1 атм показала, что за время порядка 250 пс удельная поверхностная плотность липидов сокращается от 64Å до 52 Å. В связи с этим мембрану специально растянули в латеральном направлении до начального значения площади, а затем в NVT-условиях продолжали её релаксировать в течение 750 пс. Последние 500 пс были использованы для набора статистики по давлению в расчётной ячейке. Оказалось, что средняя латеральная составляющая давления равна -330 атм, а средняя составляющая в направлении нормали к мембране равна -118 атм. После определённого перебора значений частоты баростатирования и величин давления в баростате наиболее приемлемой комбинацией оказалось следующее сочетание: частота баростатирования 1 пс⁻¹, значение давления баростата в плоскости XY (параллельной плоскости мембраны) $P_x = P_y = -260$ атм, в направлении нормали $P_z = 1$ атм. С этими значениями параметров траектория мембраны была продолжена. Релаксационные кривые приведены на рис. 2, из которого видно, что параметры мембраны поддерживаются на уровне

экспериментальных значений, а они составляют 62–68 Å для средней площади, приходящейся на липид [3, 4], и 35–54 Å для толщины бислоя [6, 7].

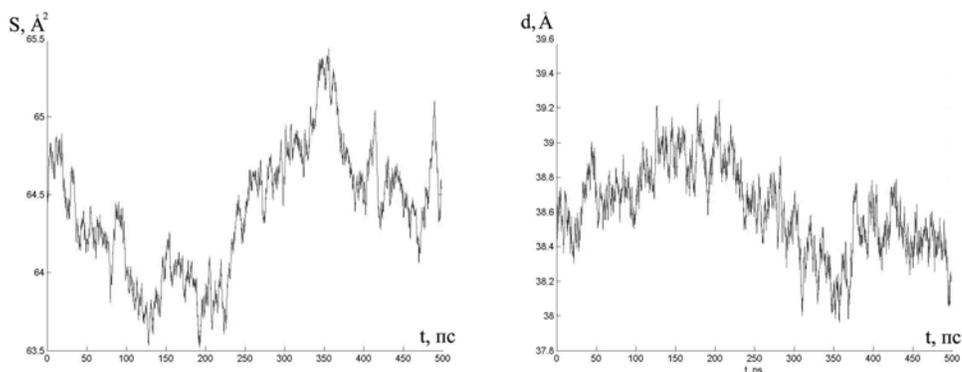


Рис. 2. Релаксационные кривые для удельной поверхностной площади липидов S (А) и толщины бислоя d (Б) ПОФХ в течение последних 500 пс расчётной траектории

Часто удельная поверхностная площадь липидов и толщина мембраны представляют собой те параметры, на которые в первую очередь ориентируются, пытаясь понять, насколько мембрана реалистично смоделирована. Есть также и другие важные параметры, на которые необходимо обращать внимание. В первую очередь это касается распределения атомных групп по нормали к мембране, экспериментальные кривые для которых установлены методами рентгеноструктурного анализа [4]. На рис. 3 представлены распределения массовой плотности.

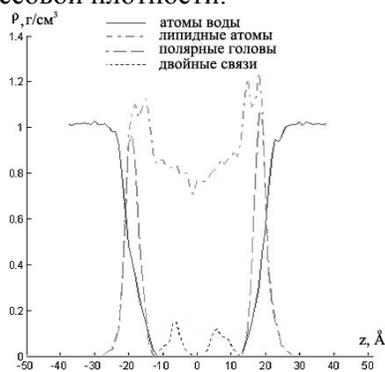


Рис. 3. Распределение массовой плотности в бислое ПОФХ

Примечание: по оси абсцисс — расстояние от центра бислоя вдоль оси Z.

В целом, мембрана, полученная на последней стадии релаксации, имеет сравнимые с экспериментальными характеристики и согласуется с данными других вычислительных экспериментов. Однако исследуемая мембрана структурно неоднородна, и можно выявить довольно много различных по своим характеристикам областей. Оказывается возможным изучить динамическую неоднородность мембраны, связанную с процессами диффузии и вязкостными свойствами среды. Для этого в работе был применён метод управляемой МД (Steered Molecular Dynamics) [8]. Суть метода в том, к некоторым частям системы прилагаются дополнительные силы (постоянные или переменные).

К пробным сферически симметричным молекулам, взаимодействующим только посредством сил Ван-дер-Ваальса, прикладывалась дополнительная постоянная сила от 0,3 ккал/Å/моль до 4 ккал/Å/моль. Эффективный радиус пробных сфер брался 2 Å и 4 Å. Время расчёта траекторий — до первого полного прохода через мембрану, но не более

800 пс. Только шары радиусом 2 \AA при силе $1\text{--}10 \text{ ккал/\AA/моль}$ проникали через мембрану за это время. Все остальные сферы оставались на поверхности, либо успевали только зайти внутрь мембраны (случай с $r = 2 \text{ \AA}$, $F_{ext} = 0.3\text{--}0.6 \text{ ккал/\AA/моль}$ и $r = 4 \text{ \AA}$, $F_{ext} = 1\text{--}4 \text{ ккал/\AA/моль}$). При значениях силы меньше 1 ккал/\AA/моль влияние возмущений среды на сферу радиусом 4 \AA было сравнимо с приложенной силой, поэтому в ходе динамики пробная молекула могла отклоняться от своего начального положения (у границы с мембраной) на пару ангстрем в сторону от мембраны.

Итак, под действием силы величиной больше критического значения молекулы проникали в мембрану с разной скоростью, в зависимости от соотношения приложенной силы и радиуса молекулы. При этом основное смещение молекулы определялось дрейфом под действием внешней силы, вклад спонтанной диффузии был крайне мал. Используя известное соотношение Стокса-Эйнштейна

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

где D — коэффициент диффузии, а γ — коэффициент вязкого трения, определяемый как отношение внешней силы к скорости, развиваемой частицей,

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

можно рассчитать микровязкость среды:

$$\eta = \frac{\gamma}{6\pi r}.$$

Рассчитанная для мембраны усреднённая вязкость определялась как поперечная вязкость мембраны, в отличие от латеральной вязкости, которая измеряется в большинстве экспериментов. Для липидных мембран последняя составляет около 1 Пз [9]. Поскольку значения микровязкости различаются на разных участках мембраны, есть смысл выделить в мембране несколько структурно, и динамически неоднородных областей. В первом приближении ими могут быть хорошо различимые области липидных голов и алкильных цепей. На рис. 4 приведены графики зависимости вязкости различных частей системы, полученные при различных значениях внешней силы, действующих на частицу радиуса 2 \AA .

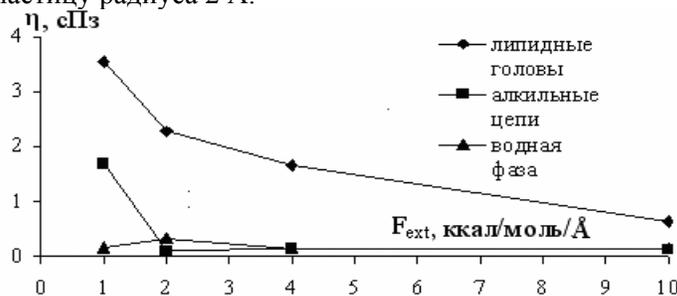


Рис. 4. Вязкость в системе ПОФХ-вода

Примечание: радиус пробной ван-дер-ваальсовской сферы 2 \AA ; давление в латеральном направлении -300 атм , в направлении нормали 1 атм .; мембрана бралась после 500 пс релаксации.

Рассчитанная вязкость воды (порядка $0,3\text{--}0,4 \text{ сПз}$) в $2\text{--}3$ раза меньше экспериментального значения и согласуется с известными оценками вязкости воды в модели ТРЗР [10]. Поперечная вязкость мембраны не превышает 4 сПз . Вязкость в центральной части бислоя в несколько раз меньше усреднённого значения. При больших силах система становится неравновесной и необходима корректировка формулы Стокса. В целом, полученные результаты свидетельствуют о неньютоновском характере среды и слабой неравновесности данной системы при скоростях движения порядка $1\text{--}10 \text{ \AA/пс}$.

Скорость проникновения молекулы под действием внешней силы зависит также и от природы молекулы. Для сравнения была рассчитана динамика проникновения в бислое остатков триптофана (эффективный радиус 4,8 Å), аланина (эффективный радиус 3,1 Å) и ван-дер-ваальсовской сферы радиуса 2 Å при внешней силе 10 ккал/Å/моль. Значения рассчитанной вязкости приведены на рис. 5.

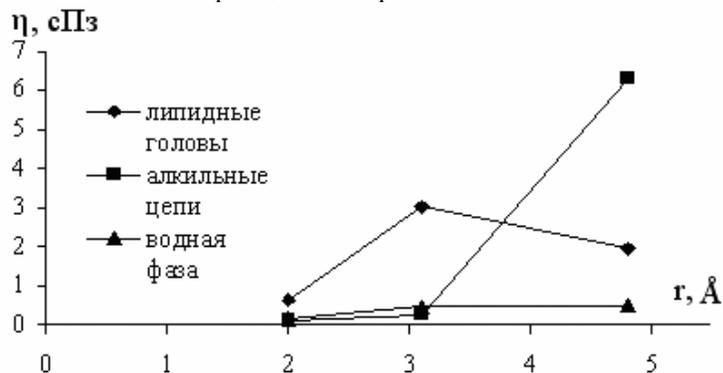


Рис. 5. Эффективная вязкость в системе ПОФХ-вода для пробных молекул

Примечание: эффективный радиус $r_{эф}$ остатка аланина 3,1 Å, остатка триптофана 4,8 Å, радиус r ван-дер-ваальсовской сферы 2 Å.

Более полярный остаток триптофана развивает большую скорость в области липидных голов, чем остаток аланина, поэтому значение вязкости для него ниже. Наоборот дело обстоит на участке гидрофобных алкильных цепей, 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 бóльшим свободным объёмом более чувствительна к размеру частиц.

На примере форсированного трансмембранного транспорта остатка аланина удалось также проследить наличие возможных факторов, облегчающих повторный проход через мембрану, связанных со структурной памятью бислоя. Порообразование, систематически направляющее процесс повторного прохода молекулы в случае тетрадеканового монослоя [11], при той же величине силы оказывается несущественным в случае с липидной мембраной. В данном эксперименте даже при резком изменении направления внешней силы на противоположное сразу же после первого прохода через мембрану остаток аланина не входит с большей скоростью в то место мембраны, из которого он незадолго до этого вышел, а вместо этого проводит перед барьерным участком на границе раздела время, большее в два раза, чем то, что он провёл перед первым проходом (рис. 6).

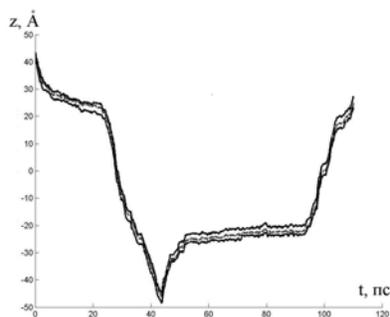


Рис. 6. Динамика прохождения остатка аланина через липидную мембрану

Примечание: Показано положение центра остатка (средняя линия) и наиболее далёкого и близкого к центру бислоя атома Ala (верхняя и нижняя линии соответственно) на оси Z. Границы бислоя ± 22 Å. В точке излома направление силы изменено на противоположное.

Развиваемый метод управляемой молекулярной динамики позволяет проводить целенаправленные вычислительные эксперименты, весьма полезные для определения локальных свойств микрогетерогенных систем. Используемый выше метод «компьютерного вискозиметра» позволяет выявить различия в диффузионных свойствах у молекул разной природы и определить вязкостные характеристики, трудно доступные в обычных экспериментах. Имея возможность сравнивать вычисляемые параметры с данными, получаемыми, например, из экспериментов по атомно-силовой микроскопии, можно также надеяться использовать последнюю как мощный калибровочный инструмент для уточнения параметров силовых полей для мембранных систем.

Литература

1. Lemak A.S., Balabaev N.K. // Mol. Simul., №13 1994. P. 177.
2. Wang J., Cieplak, Kollman P.A. // J. Comp. Chem., №21 2000. P. 1049.
3. Evans R.W., Williams M.A., Tinoco J. // Biochem J., №245 1987. P. 455.
4. Pabst G., Rappolt M., Amenitsch H., Laggner P. // Phys. Rev. E., №62 2000. P. 4000.
5. Rabinovich A.L., Ripatti P.O., Balabaev N.K. // J. Biol. Phys., №25 1999. P. 245.
6. Rand R., Parsegian V. // BBA, №998 1989. P. 351.
7. Salamon Z., Lindblom G., Rilfors L., Linde K., Tollin G. // Biophys. J., № 78 2000. P. 1400.
8. Park S., Schulten K. // J. Chem. Phys., №120 2004. P. 5946.
9. Hughes B.D., Pailthorpe B.A., White L.R., Sawyer W.H. // Biophys. J., №37 1982. P. 673.
10. Mahoney M.W., Jorgensen W.L. // J. Chem. Phys., №114 2001. P. 363.
11. Турлей Е.В., Шайтан К.В. // Неопубл. результаты, 2003.

Секция «Биология»

Выделение из *Cucumis melo* L. и характеристика новых глицин-богатых полипептидных молекул — потенциальных компонентов защитной системы растений

А.А. Василевский

Биологический факультет

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Аннотация

Из семян дыни выделены два антимикробных полипептида, которые ингибируют рост ряда фитопатогенных грибов в концентрациях порядка 10 мкМ. Для полипептида с молекулярной массой 11,7 кДа установлена частичная, а для пептида с молекулярной массой 3 кДа полная аминокислотная последовательность. Показано, что выделенные соединения относятся к группе глицин-богатых белков; проведено сравнение с уже известными глицин-богатыми полипептидами растений. Анализ структуры выделенных веществ выполнен на основании полученных спектров кругового дихроизма.

Summary

Two antimicrobial polypeptides, which inhibit growth of several fungal plant pathogens at concentrations around 10 μ M, were purified from melon seeds. The partial N-terminal amino acid sequence of 11,7 kDa polypeptide and the complete amino acid sequence of 3 kDa peptide were determined. The purified compounds were shown to be members of the glycine-rich protein group and compared with the known plant glycine-rich proteins. Structure analyses of the purified polypeptides were based on the circular dichroism spectra.

Введение

Выступая с докладом на биологическом факультете Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, один из основоположников