

УДК 573

НЕРАВНОВЕСНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА НАНОСТРУКТУР, ВКЛЮЧАЯ БИОЛОГИЧЕСКИЕ

© 2006 г. 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

Поступила в редакцию 22.12.2005

Обсуждаются методические вопросы и новые направления, связанные с моделированием неравновесной динамики молекул в гетерогенных системах. Рассмотрены явления диффузии в неоднородных и анизотропных структурах (биомембранах), распределение аминокислотных остатков на границе раздела фаз. Практически впервые в полноатомном приближении рассмотрена динамика транспорта ионов через грамицидиновый канал и канал глицинового рецептора, а также динамика взаимодействия углеродных нанотрубок с биологическими мембранами, самосборка комплекса полиаланина и нанотрубки, функционирование молекулярного устройства для доставки молекул через мембрану (наношприц), фолдинг и рефолдинг полимерной цепи при взаимодействии с нанотрубкой.

Методы молекулярной динамики в настоящее время широко применяются как при изучении фундаментальных проблем естествознания, так и прикладных задач молекулярной биоинженерии, биотехнологии, нанотехнологии, материаловедения, астрофизики и др. [1, 2]. 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, т.е. молекулярной динамики только под воздействием межатомных взаимодействий, так и неравновесной (или управляемой) молекулярной динамики (Steered molecular dynamics [3]) 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 требуются более совершенное программное обеспечение и дополнительные аналитические усилия при интерпретации результатов. Ниже кратко рассмотрено несколько примеров использования управляемой молекулярной динамики для исследования достаточно сложных молекулярных систем.

ДИНАМИКА БИОМЕМБРАН

Биологические мембраны в последние годы являются предметом пристального изучения [4–8]. Однако данные по кинетическим свойствам фосфолипидного бислоя с учетом его анизотропии и неоднородности малодоступны. Ниже исследуется проблема неоднородности и анизотропии фосфолипидного бислоя при диффузии относительно небольших молекул. Мембрана состояла из бислоя 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (ПОФХ), содержащего 64 молекулы липида. Степень сольватации определялась соотношением 44 молекулы воды на молекулу липида. Использовалась модель воды TIP3P, причем валентные связи и валентные углы в молекулах воды не фиксировались, а определялись соответствующими потенциалами. Поверхностная плотность липидов была близкой к экспериментальным значениям ($62\text{--}68 \text{ \AA}^2$ [9–12]). Расчеты молекулярной динамики (МД) проводились пакетом RUMA [13], который был специально модифицирован для включения управляющих воздействий [5, 6]. Решение системы классических уравнений движения атомов проводилось в силовом поле Amber 99 [14].

Использовались периодические граничные условия, столкновительный термостат [13] ($T = 300 \text{ K}$) и баростат Берендсена [15]. Контролировалось достижение локального равновесия системой по флуктуациям объема, давления и температуры [5].

ДИФФУЗИЯ МОДЕЛЬНЫХ СФЕР В БИОМЕМБРАНЕ

Для вычисления параметров, определяющих диффузию молекул в мембране, использовалась

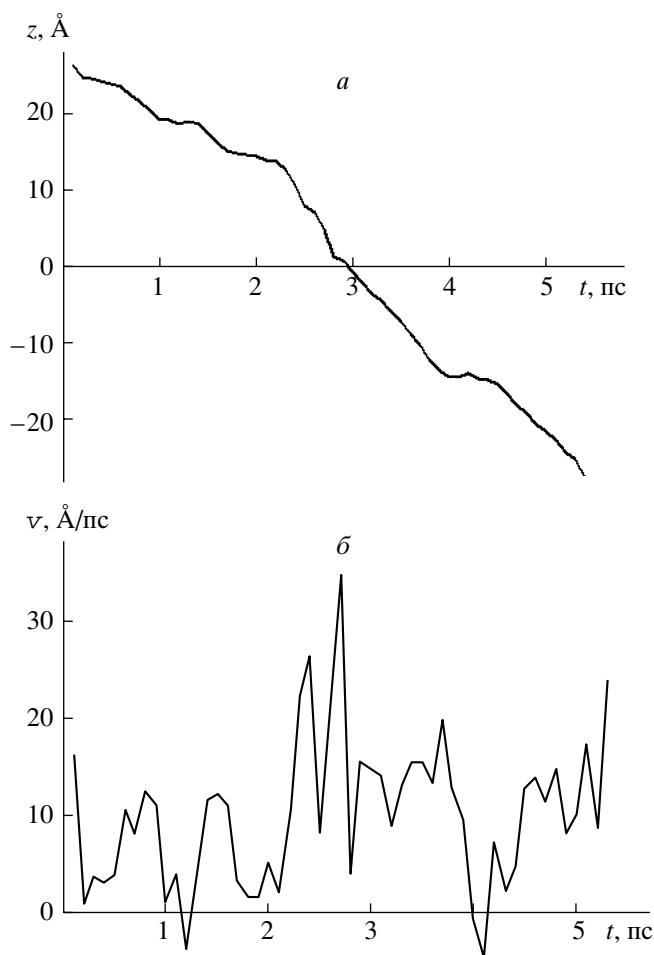


Рис. 1. Кинетические кривые прохода пробного ван-дер-ваальсовского шара радиусом 2 Å под действием силы в $10 \text{ ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1}$ в направлении нормали. *a* – Положение шара на оси Z (нормали мембраны). Центр бислоя находится при $z = 0$, границы – при $z = \pm 20 \text{ Å}$. *б* – Скорость продвижения шара, усредненная по интервалу 0.1 пс.

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 Å (т.е. порядка радиуса атома углерода и небольшой функциональной группы соответственно), взаимодействующие с остальными атомами только посредством сил Ван-дер-Ваальса (константа взаимодействия $\epsilon = 0.15 \text{ ккал/моль}$), 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 Å от мембраны, во втором – помещался в центр мембраны, и релаксация системы проводилась в течение 2 пс. Далее прикладывалась сила величиной от 0.3 до 4 $\text{ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1}$ (1 $\text{ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1} = 7 \cdot 10^{-6} \text{ дин}$). В случае шара

радиусом 2 Å бралось также значение силы $10 \text{ ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1}$ (рис. 1).

Согласно проведенным тестовым расчетам, в воде ТРЗР шары радиуса 2 и 4 Å при внешней постоянной силе в $10 \text{ ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1}$ движутся со средними скоростями 10 и 2.6 Å/пс соответственно. Отклонение от гидродинамической формулы Стокса обусловлено двумя обстоятельствами. Во-первых, радиусы частицы таковы, что приближение сплошной среды не работает. Во-вторых, величина приложенной силы и, соответственно, скорость движения относительно велики и условие ламинарного обтекания также не соблюдается. Вместе с тем качественно соотношение Стокса работает и на микроуровне. 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 Å при силе 1–10 $\text{ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1}$ 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 $\text{ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1}$ влияние возмущений среды на шар радиусом 4 Å 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 Å.

При величине силы больше критического значения (например, 1 $\text{ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1}$ для шара радиусом 2 Å) 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 $10 \text{ ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1}$. При анализе кинетических характеристик, полученных в расчете с $F_{ext} = 1 \text{ ккал/моль} \cdot \text{Å}^{-1}$, учитывалось время расчета 75 пс, в течение которого частица обставалась в центре бислоя.

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

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

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

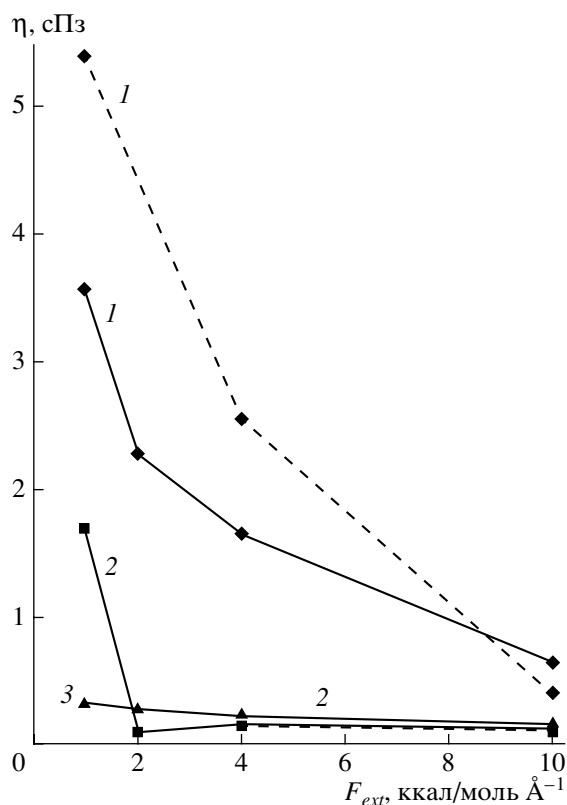


Рис. 2. Вязкость в системе ПОФХ–вода. Радиус пробного Ван-дер-ваальсовского шара – 2 Å. Сплошными линиями отмечены данные для системы после предварительной релаксации системы в течение 500 пс, штриховой – после окончательной релаксации в течение 1 нс; 1 – липидные головы, 2 – алкильные цепи, 3 – водная фаза.

[16–18]. Для ПОФХ известна также экспериментальная оценка усредненной вязкости порядка 18 сПз [19]. 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 рис. 2 приведены графики зависимости коэффициента трения в терминах микровязкости для различных частей системы, полученные при различных значениях внешней силы, действующей на частицу радиусом 2 Å в направлении нормали к мембране.

Рассчитанные значения эффективной вязкости воды для шара радиусом 2 Å 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 [20]. Поперечная вязкость мембраны для частиц такого размера не превышает 6 сПз. Вязкость в центральной части бислоя в несколько раз меньше этого значения (рис. 3).

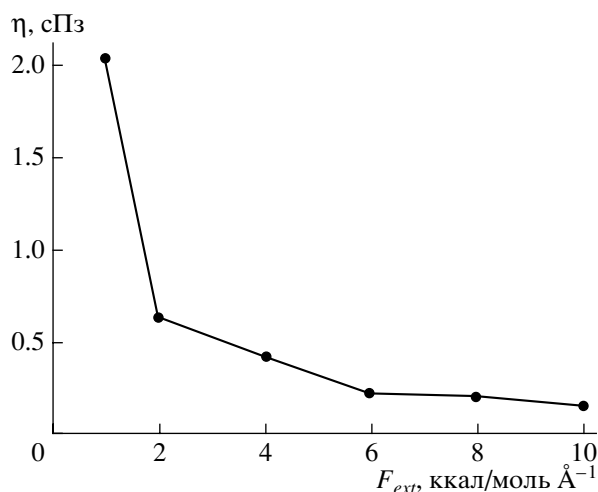


Рис. 3. Вязкость в центре бислоя ПОФХ. Радиус пробного Ван-дер-ваальсовского шара – 2 Å.

Для латерального смещения шара под действием силы данные представлены на рис. 4. Значения вязкости в данном случае очень близки к значениям вязкости, измеренной в области алкильных хвостов в направлении нормали.

Отметим, что для частиц радиусом 2 Å формула Стокса в области алкильных хвостов практически не работает. В целом, полученные результаты свидетельствуют о неньютонском характере среды и слабой неравновесности данной системы при скоростях движения порядка 1–10 Å/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 Å), аланина (эффективный радиус – 3.1 Å, рис. 4) и ван-дер-ваальсовской сферы радиусом 2 Å. Полученные значения вязкости приведены на рис. 5. В случае многоатомных молекул сила прикладывалась равномерно ко всем атомам системы.

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, причем 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.

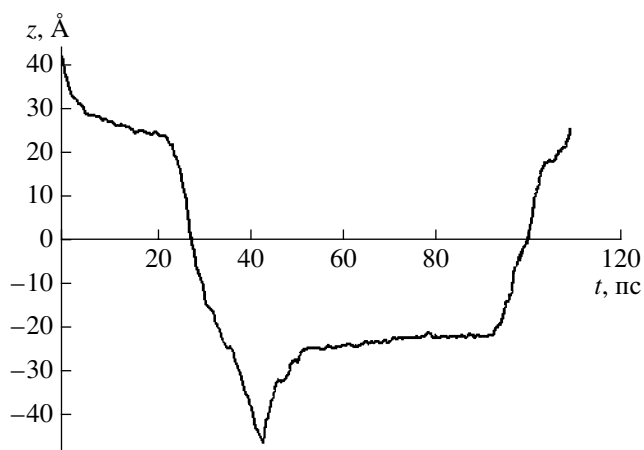


Рис. 4. Динамика прохождения остатка аланина через липидную мембрану. Показано положение геометрического центра остатка. Границы бислоя находятся в положениях ± 22 Å. В точке излома направление силы было изменено на противоположное.

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 проведен 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 $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R})-\text{CO}-$, т.е. как незаряженный мономер с формально ненасыщенными связями. Использовался программный комплекс PUMA. Выбиралась периодически граничные условия, силовое поле Amber 99 и модель воды TIP3P с нефиксированными внутренними степенями свободы. Для системы вода/гексан использовался баростат Берендсена вдоль оси, перпендикулярной границе раздела фаз. Система вода/вакуум моделировалась в NVT-ансамбле, плотность воды соответствовала нормальным условиям.

Для оценки гидрофобных свойств аминокислотных остатков проводилась статистическая обра-

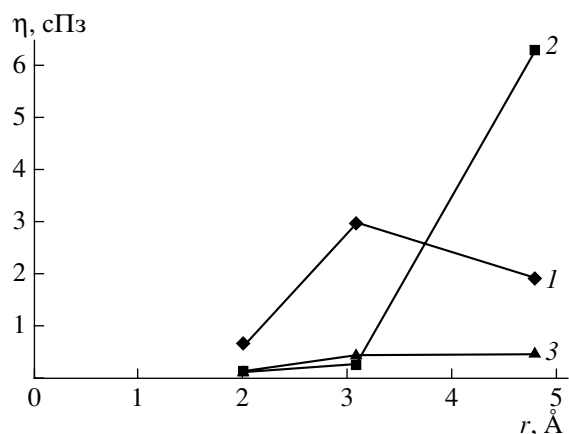


Рис. 5. Зависимость микровязкости от эффективного радиуса пробных молекул в системе ПОФХ–вода. Суммарная сила $F_{ext} = 10$ ккал/моль \cdot Å $^{-1}$; 1 – липидные головы, 2 – алкильные цепи, 3 – водная фаза.

ботка траекторий и анализировались пространственные и ориентационные распределения остатков. Ниже проведено сравнение этих двух моделей.

Рассмотрим поведение фенилаланина на границе раздела фаз вода/гексан. На рис. 6 приведены усредненные по времени профили плотности воды и гексана. Видно, что граница раздела фаз представляет собой переходный слой толщиной около 5 Å. На рис. 7 приведены распределения для положений центров масс остова и боковой цепи фенилаланина. Максимумы распределений практически точно соответствуют середине межфазного слоя, т.е. молекула проявляет поверхностно-активные свойства. При этом графики



Рис. 6. Профили плотности воды и гексана вдоль оси, перпендикулярной разделу фаз, нормированные на единицу, в системе вода/гексан. Сплошной линией обозначена гексановая фаза, штриховой – водная фаза.



Рис. 7. Графики плотности вероятности для положений центров масс остова и боковой группы аминокислотного остатка в системе вода/гексан. Сплошной линией обозначена боковая группа, штриховой — остов.

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, соединяющий центры масс остова и боковой цепи образует с поверхностью раздела фаз угол, равный в среднем около 30° , т.е. молекула как бы лежит на границе раздела.

Рассмотрим далее динамику фенилаланина в системе с виртуальной отталкивающей стенкой. Из рис. 8 видно, что для системы с отталкивающей стенкой крутизна профиля плотности водной

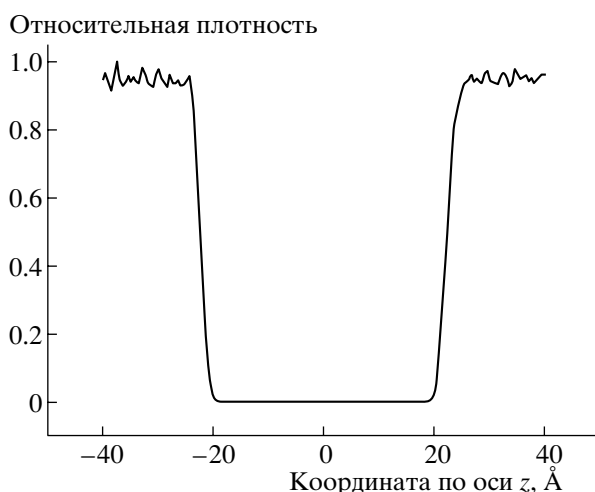


Рис. 8. Профиль плотности воды вдоль оси, перпендикулярной отталкивающей стенке, в системе вода/вакуум.

фазы больше, чем в системе вода/гексан. Отсутствие неполярной фазы гексана несущественно изменяет форму и ширину распределений для аминокислотного остатка (рис. 9). 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 системе вода/вакуум незначительно отличается от таковой в системе вода/гексан.

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 [21, 22], так и широко применяется в фармакокинетике [23]. Гидрофобность — один из важнейших параметров для реакций, катализируемых ферментами. Сайты связывания последних весьма восприимчивы к гидрофобным участкам молекул субстрата [24]. При анализе распределений остатки всех основных типов аминокислот в первом приближении разделились на две группы. Первая группа имеет 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 груп-



Рис. 9. Графики плотности вероятности для положений центров масс остова и боковой группы аминокислотного остатка в системе вода/вакуум. Сплошной линией обозначена боковая группа, штриховой — остов.

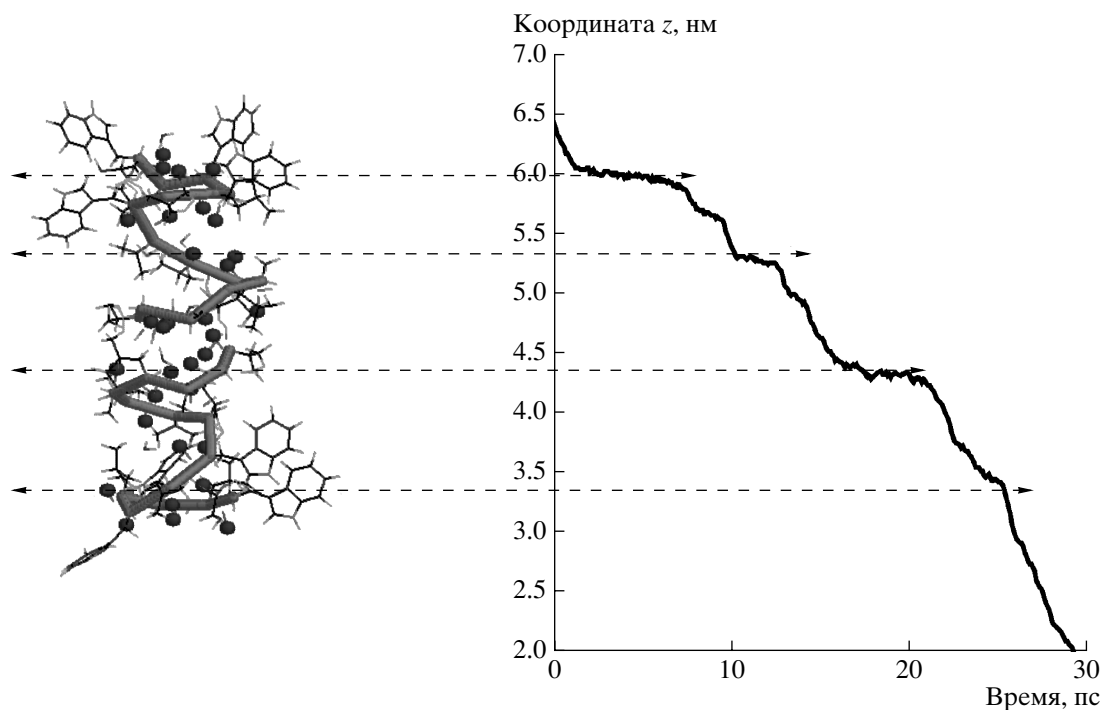


Рис. 10. Динамика прохождения иона Na^+ через пору канала. Показаны области замедления ионного транспорта за счет взаимодействия с областями локализации частично отрицательно заряженных атомов кислорода основной цепи молекул грамицидина А.

пе 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 сопротивление мембраны [25–27]. Известны две конформации грамицидинового канала в мембране: спираль-

ный димер и двойная спираль [28], которые различаются по стабильности и функциональной активности [29]. 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) [30]. Использовались: стохастическая динамика с параметром 0.02 пс, периодические граничные условия, баростат Берендсена (вдоль оси нормали мембраны поддерживалось давление в 1 бар, 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 Å над порой канала. Вокруг катиона достаточно быстро формировалась гидратная оболочка из 6 молекул воды. К иону натрия прикладывалось ускорение 25 nm/ps^2 вдоль оси нормали мембраны (что эквивалентно силе в 13 ккал/моль Å⁻¹).

Катион натрия при вхождении в полость поры раздвигает атомы полярных головок липидов и молекул грамицидина (рис. 10). 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:

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

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

Эта оценка дает для коэффициента диффузии в грамицидиновом канале значение $0.6 \cdot 10^{-5}$ см²/с, что более, чем в 2 раза меньше значения коэффициента диффузии иона в воде ТРЗР, полученного тем же методом ($1.5 \cdot 10^{-5}$ см²/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 γ -аминомасляной кислоты ГАМК_A и ГАМК_C обеспечивают быструю нейротрансдукцию в различных отделах ЦНС, формируя тормозные синапсы. Все лиганд-зависимые рецепторы имеют пентамерную структуру [31]. Каждая субъединица рецептора (рис. 11а) состоит из четырех α -спиралей и содержит четыре трансмембранных домена: TM1–TM4 [32]. Активация глициновых рецепторов, приводящая к открытию хлорных каналов, происходит при связывании глицина; при этом считается, что основную роль в миграции ионов играют домены TM2, непосредственно формирующие пору канала (рис. 11б) и, таким образом являющиеся наиболее важным компонентом с точки зрения функциональной активности рецептора. [33, 34]. С мутациями в субъединицах глицинового рецептора связаны некоторые патологии, в частности, рефлекс гиперстреха в ответ на неожиданные раздражения [35].

В работе использовалась модель канала, состоящего из пяти α -спиралей TM2 подтипа $\alpha 1$ (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.12). 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 Amber 99. К иону Cl⁻ прикладывалась постоянная сила в 5 ккал/моль · Å⁻¹ вдоль оси нормали.

На рис. 13 представлена динамика прохождения иона Cl⁻ сквозь пору глицинового рецептора под действием 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. рис. 11б). Значение эффективного коэффициента диффузии иона Cl⁻ колеблется в пределах $1.38 \cdot 10^{-5}$ – $1.45 \cdot 10^{-6}$ см²/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 [36] рассматривался, в частности, процесс спонтанного встраивания модельной нанотрубки в фосфолипидный бислой с использованием так называемого “coarse-grain”-приближения. Однако до сих пор практически нет публикаций по динамике взаимодействия биомембран с углеродными нанотрубками в полноатомном приближении.

В настоящей работе изучалась динамика проникновения углеродной нанотрубки диаметром 13.5 Å и длиной 32 Å 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 – порядка $2 \cdot 10^5$ бар). При таком давлении нанотрубка проходит через фосфолипидный бислой за время порядка 200 пс (рис. 14), выталкивая из бислоя две молекулы фосфолипида.

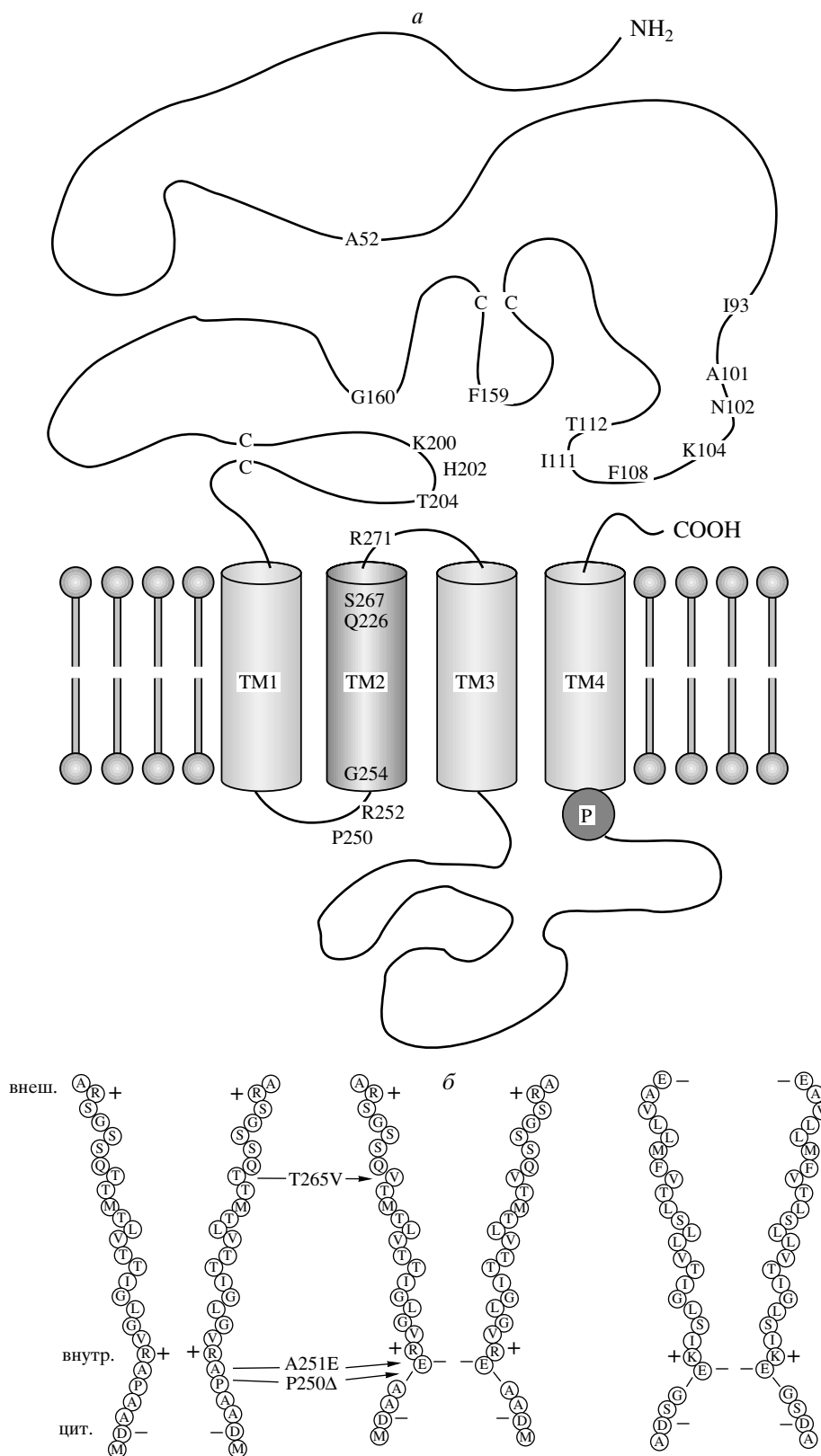


Рис. 11. *a* – Мембранная топология α -субъединицы глицинового рецептора; более темный на рисунке – трансмембранный домен TM2, формирующий пору (по [32]). *б* – Схематическое представление двух трансмембранных доменов TM2 и соответствующих сечений пор гомомерных рецепторов: глицинового рецептора дикого типа и глицинового рецептора с тройной мутацией, из $\alpha 1$ -субъединиц, а также никотинового ацетилхолинового рецептора из $\alpha 7$ -субъединиц (по [34]). Показаны три заряженных кольца, оказывающих влияние на миграцию ионов: внеклеточное (внеш.), внутреннее (внутр.) и цитоплазматическое (цит.).

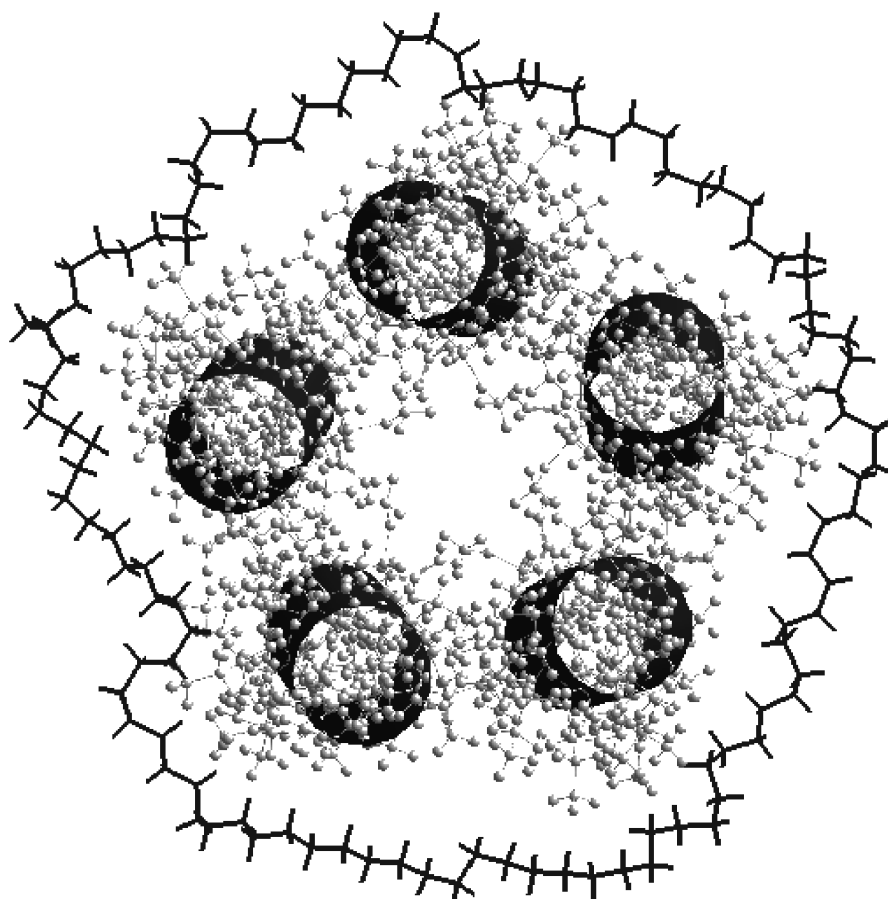


Рис. 12. Канал, стабилизированный углеводородным кольцом.

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 [37] проводится расчет проникновения одонитового ДНК-олигонуклеотида в нанотрубку в водной среде. Авторы работы [38] рассматривают прохождение РНК под действием приложенной силы через отверстия в коротких нанотрубках, организованных в монослой. В [39] изучались адсорбция амилозы на нанотрубке в водной среде и ее проникновение внутрь.

В проведенном нами численном эксперименте было обнаружено явление самосборки следующей структуры: α -спираль полиаланина из 15 остатков внутри углеродной нанотрубки. При 300 К

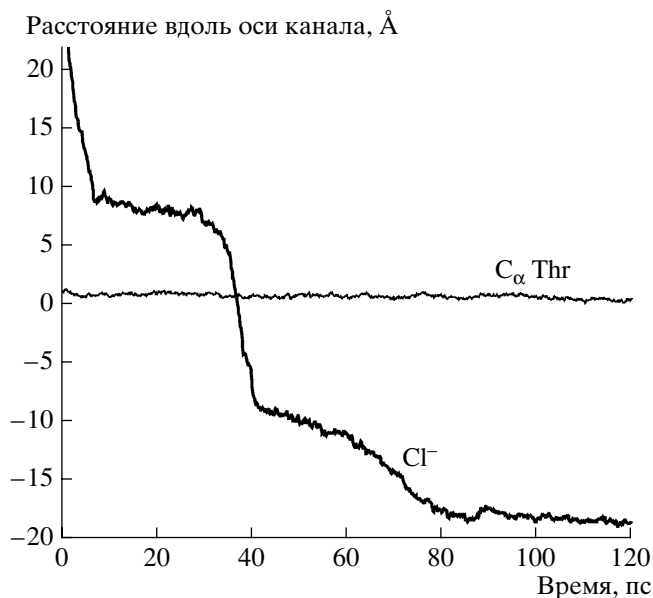


Рис. 13. Динамика прохождения иона Cl^- через пору канала. Внешняя сила – 10 ккал/моль. Для сравнения показана динамика атома углерода основной цепи одной из субъединиц.

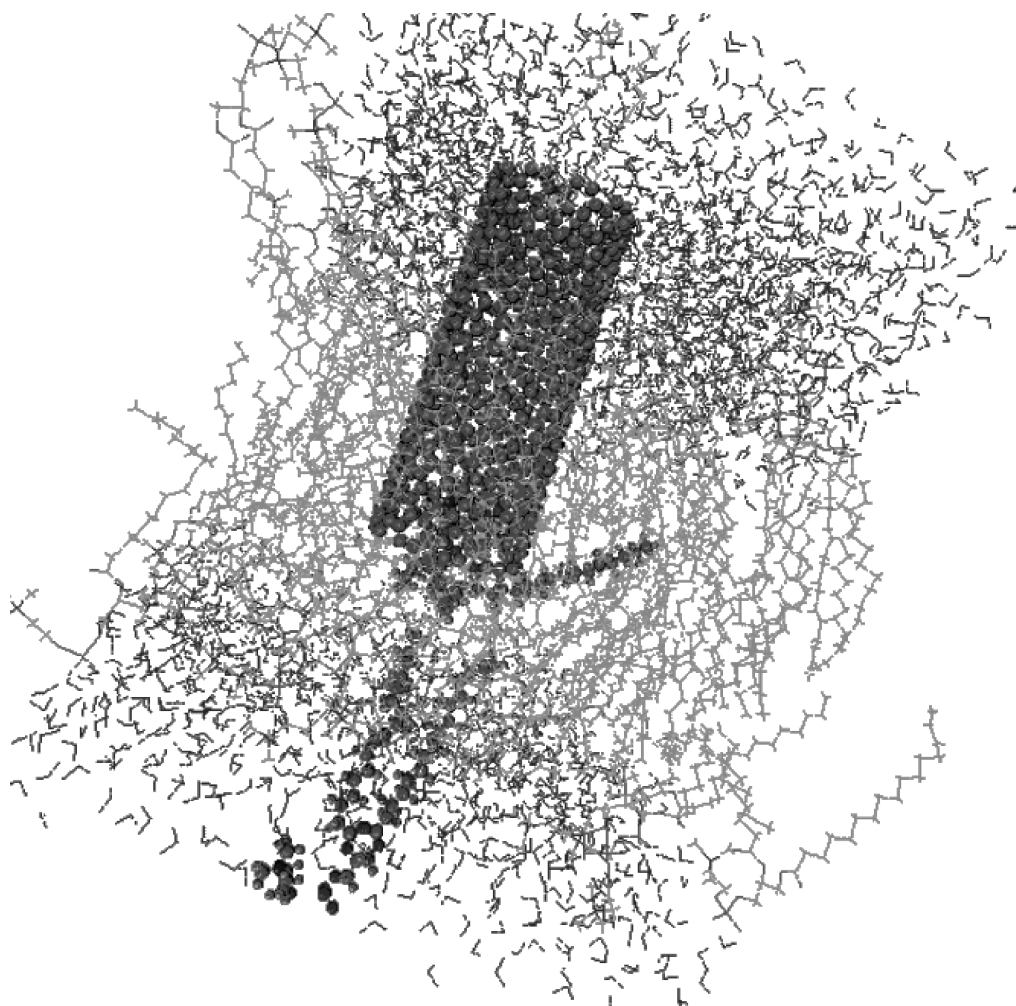


Рис. 14. Углеродная нанотрубка протыкает фосфолипидный бислой. Молекулы ПОФХ, выталкиваемые из слоя изображены более подробно.

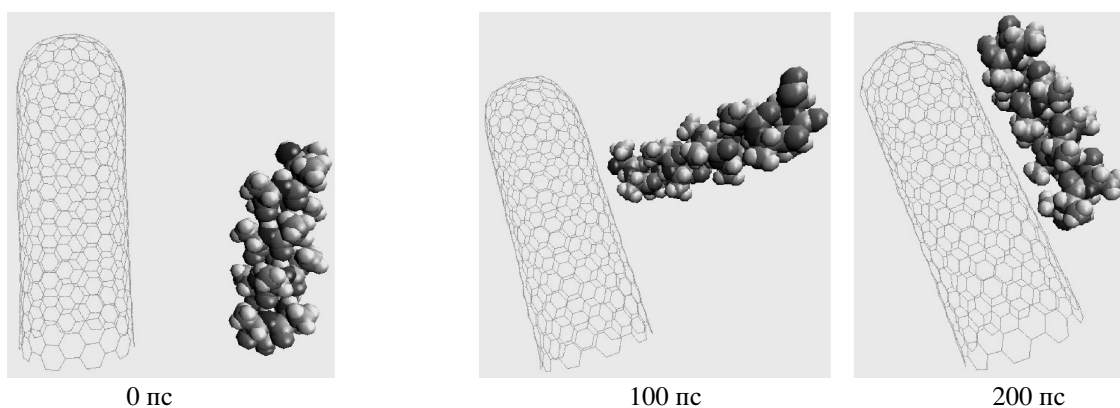


Рис. 15. Последовательные стадии прилипания полиаланина к внешней поверхности нанотрубки (слева направо – 0 пс, 100 пс, 200 пс).

за время порядка 200 пс происходит адсорбция (рис. 15) полипептида в альфа-спиральной конформации на поверхности нанотрубки (исходное положение пептида – на расстоянии 30 Å 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 нанотруб-

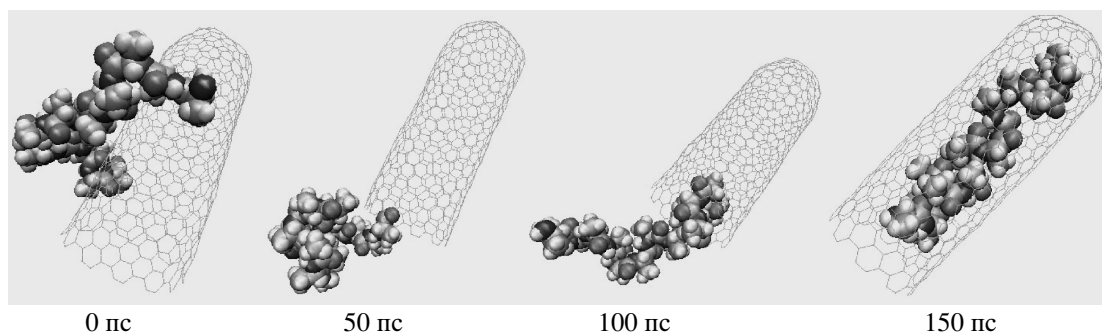


Рис. 16. Последовательные стадии самосборки комплекса пептида и нанотрубки при 1000 К (слева направо – 0 пс, 50 пс, 100 пс, 150 пс).

ку. Несмотря на то, что выигрыш 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, так как энергия адсорбции полипептида уменьшается при смещении пептида к краю нанотрубки.

На рис. 16 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 флуктуации 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 продолжается 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 мембрану

в клетку или отдельный компартмент. Изучение 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 были смоделированы наношприц и акт выталкивания полиаланина из нанотрубки в бислойную мембрану и в воду.

В качестве действующего агента, выталкивающего полиаланин из нанотрубки, брались 8 расширяющихся ван-дер-ваальсовых сфер. Увеличение радиуса сфер происходило со скоростями 0.25 и 0.5 Å/пс (время расширения составляло 26 или 13 пс соответственно) до значений радиуса порядка радиуса нанотрубки. Это создавало практически “нановзрыв” и система срабатывала как “наношприц”. На рис. 17 и 18 приведен сценарий выброса пептида при таких экстремальных параметрах “выстрела” с максимумом давления в нанотрубке порядка 10^5 бар. В момент “выстрела” нанотрубка несколько деформируется, но эти деформации не выходят за пределы ее прочности. По окончании процесса выталкивания пептида нанотрубка полностью восстанавливает первоначальную конфигурацию 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. Из рис. 19 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.

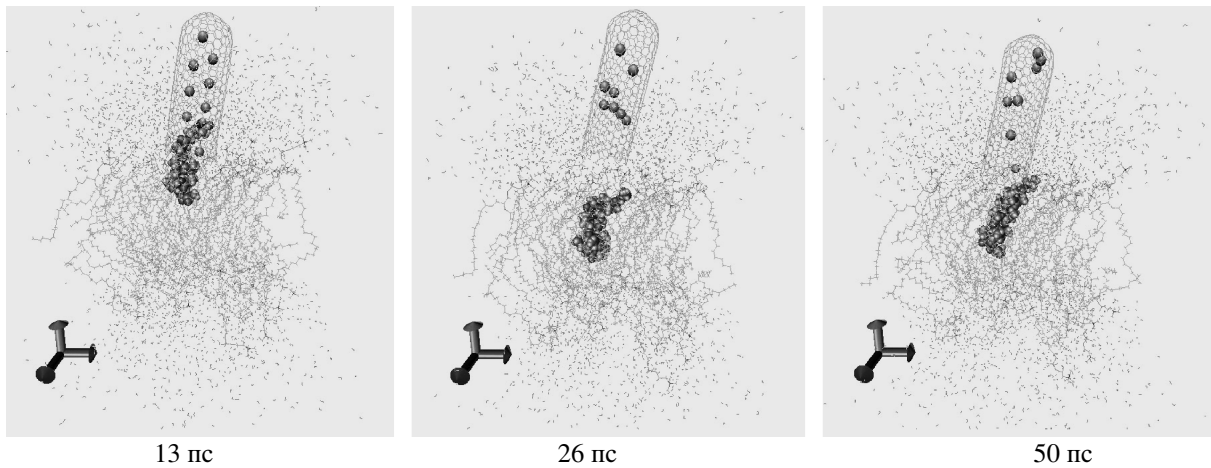


Рис. 17. Последовательные стадии выталкивания пептида в мембрану (слева направо – 13 пс, 26 пс, 50 пс).

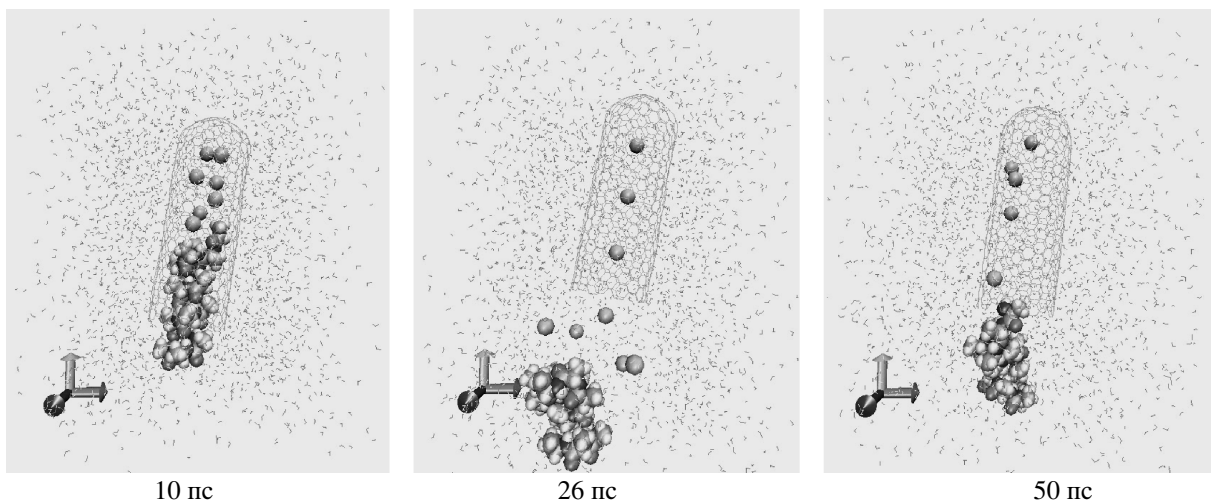


Рис. 18. Последовательные стадии выталкивания пептида в воду (слева направо – 10 пс, 26 пс, 50 пс).

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 [40, 41]. Отметим, что специфическое сворачивание характерно даже для обычной свободно-сочлененной цепочки с включенным леннард-джонсовским взаимодействием между звеньями [42–44].

Проводились вычислительные эксперименты по сворачиванию гомополимерной цепочки. Взаимодействия соседних атомов определялись потенциалом валентной связи. Взаимодействия атомов (звеньев цепи), разделенных двумя и более

валентными связями, описывались с помощью потенциала Леннарда-Джонса вида

$$U = \sum_i \sum_j U_{LD}(r_{ij}),$$

$$U_{LD}(r_{ij}) = \epsilon \left[\left(\frac{r_{min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{min}}{r_{ij}} \right)^6 + 1 \right].$$

Параметры потенциала ϵ и r_{min} зависят от типов звеньев i и j , участвующих во взаимодействии; r_{ij} – расстояние между этими звеньями. Параметр r_{min} определяет положение минимума, а параметр ϵ – глубину потенциальной ямы. В качестве стартовой конфигурации бралась вытянутая цепочка. В результате, в зависимости от параметров силового поля, образовывался целый ряд упорядоченных структур. Тип конечной структуры зависит в основном от отношения параметра r_{min} потен-

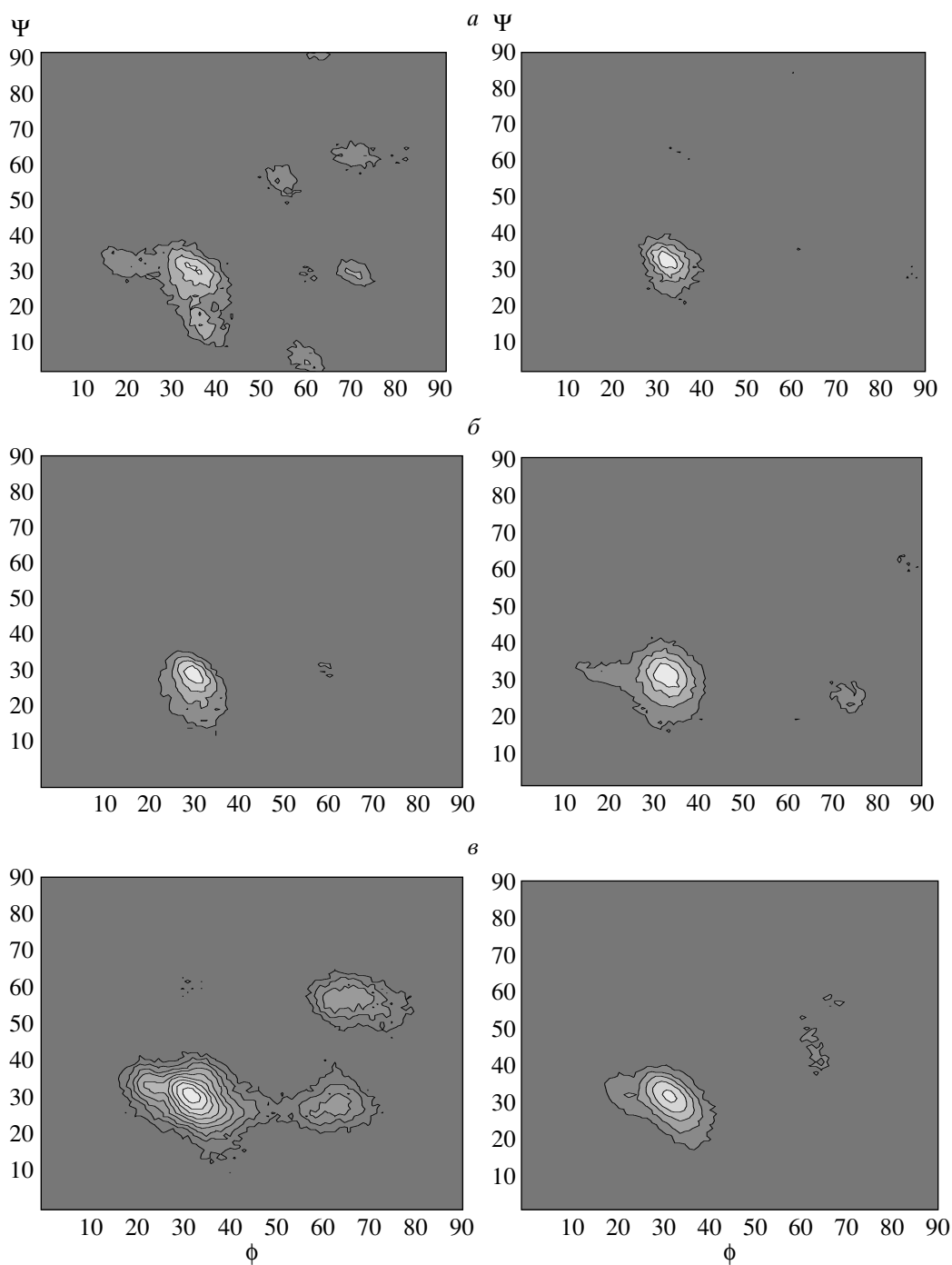


Рис. 19. Сечения Пуанкаре для полиаланина по углам ϕ и ψ основной цепи при выталкивании в мембрану (а), воду (б) и вакуум (в) с расширением выталкивающих сфер за времена 13 (слева) и 26 пс (справа).

ла Леннарда-Джонса к равновесной длине валентной связи.

В качестве возникающих структур наблюдались: всевозможные слои, правые и левые спирали, двойные спирали, шпильки, а также структуры, состоящие из свернутых петель. Многие из них сходны с элементами вторичной структуры белков и нуклеиновых кислот (рис. 20).

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.

Рассматривалась также динамика сворачивания при взаимодействии со вспомогательными структурами, которые позволяли формировать строго

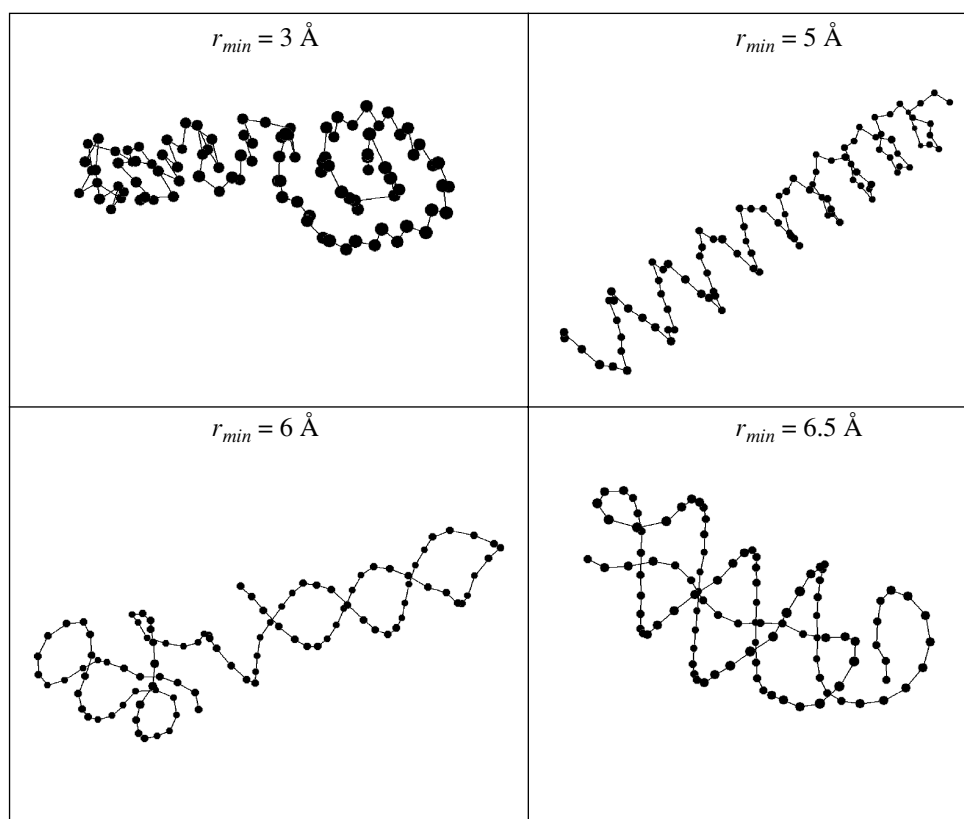


Рис. 20. Типы конечных структур, образующихся при разных значениях параметра r_{min} из вытянутой цепочки (равновесная длина валентной связи $b = 2 \text{ \AA}$).

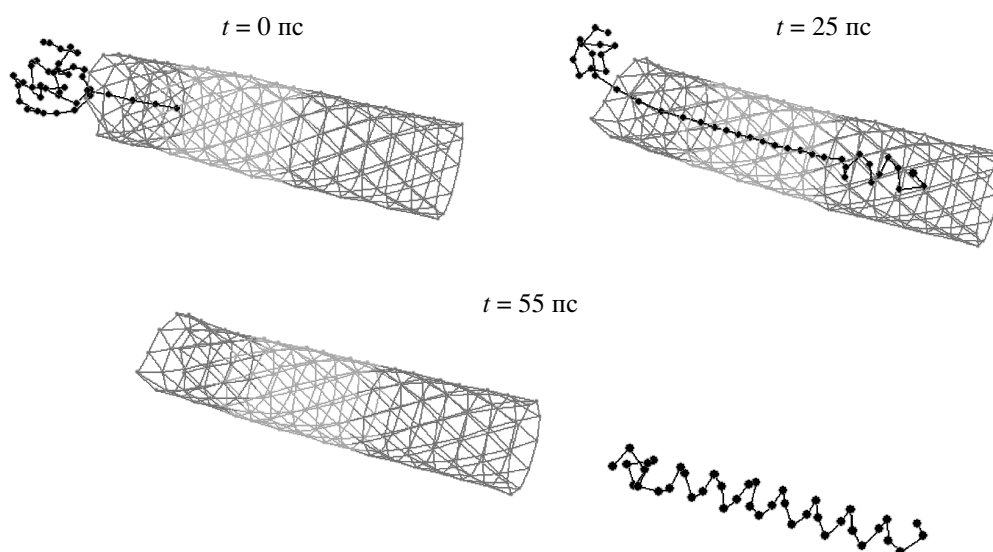


Рис. 21. Рефолдинг полимерной цепочки при взаимодействии с модельной нанотрубкой.

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 Hsp 60, мембранные каналы) [45–47].

Был рассмотрен рефолдинг полимерной глобулы в спираль при специфическом взаимодействии полимера с модельной нанотрубкой. Полимерная

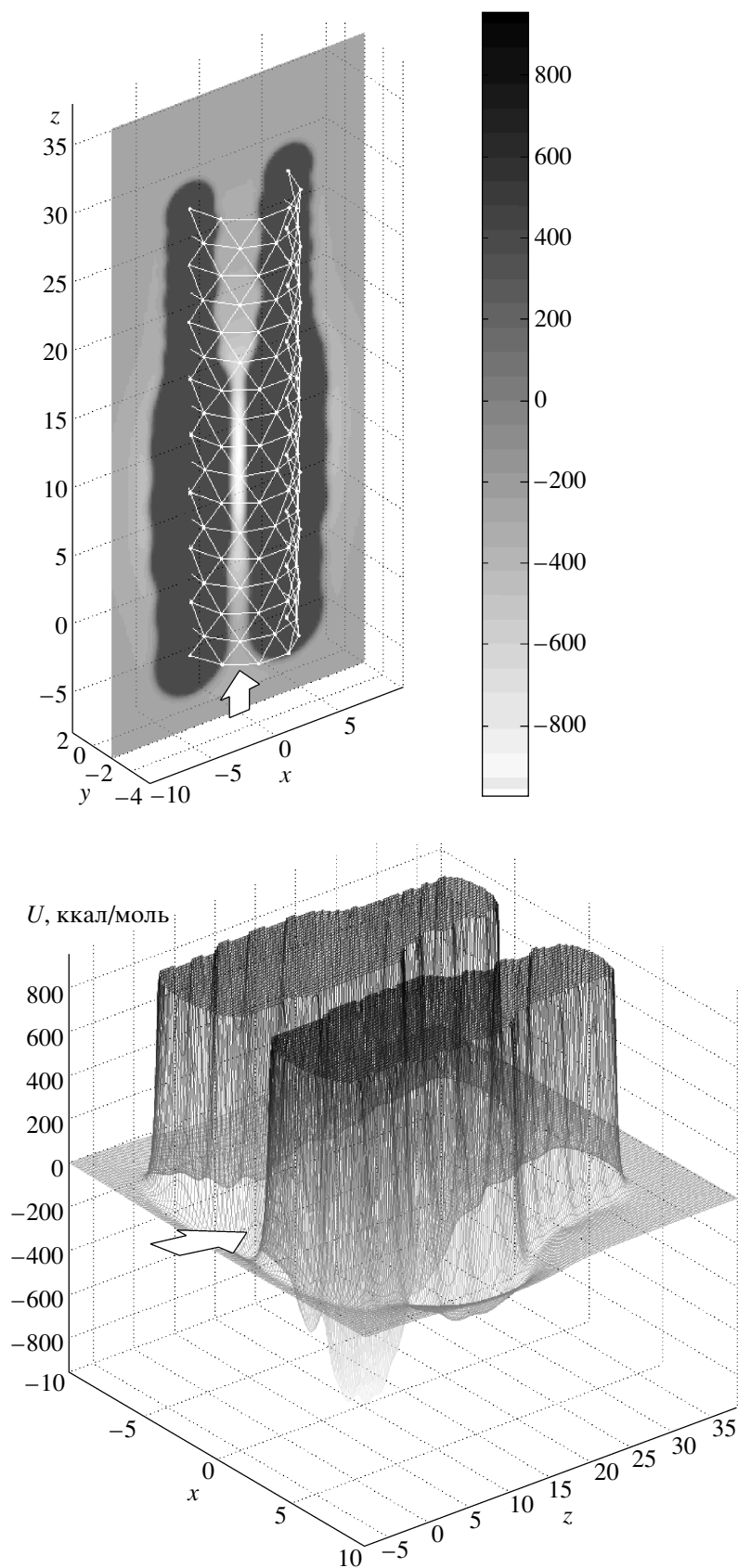


Рис. 22. Трехмерное сечение гиперповерхности потенциальной энергии взаимодействия нанотрубки с цепочкой, проходящее через ось нанотрубки.

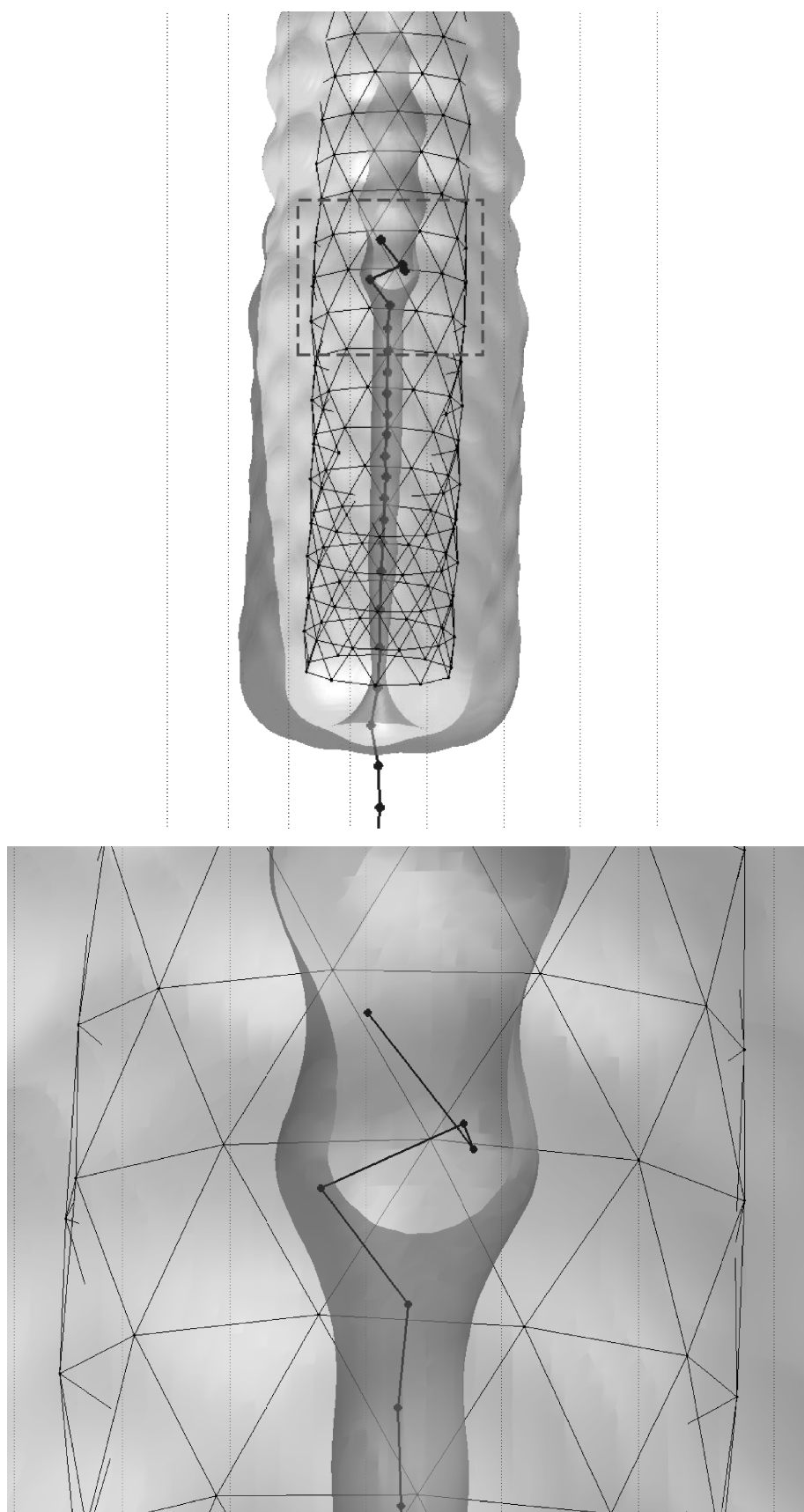


Рис. 23. Сечение гиперповерхности потенциальной энергии взаимодействия модельной нанотрубки с полимерной цепочкой. Показан этап образования зародышевой спиральной структуры.

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 рис. 22, 23.

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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неравновесная (или управляемая) молекулярная динамика оказывается полезным инструментом для получения детальной и экспериментально труднодоступной 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 важно отметить 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 малопродуктивен. Во-вторых, в рамках развиваемого неравновесного подхода осуществляется контроль за 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 и при изучении больших внешних воздействий, соответствующих взрыву или детонации.

Авторы благодарят Оргкомитет за прекрасную организацию школы-симпозиума и финансовую поддержку.

Авторы признательны Российскому фонду фундаментальных исследований (грант № 04-04-49645), Министерству образования и науки РФ и Правительству Москвы за финансовую поддержку проводимых научных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Frenkel D., Smit B.* Understanding molecular simulation: from algorithms to applications, 2nd edn. San Diego: Academic Press, 2002.
2. *Шайтан К.В., Терешкина К.Б.* Молекулярная динамика белков и пептидов (методическое пособие). М.: Ойкос, 2004.
3. *Park S., Schulten K.* // J. Chem. Phys. 2004. V. 120. P. 5946.
4. *Chizmadzhev Y.A.* // Bioelectrochemistry. 2004. V. 63. P. 129.
5. *Турлей Е.В., Шайтан К.В., Балабаев Н.К.* // Биол. мембраны. 2005, Т. 22, № 6. С. 491.
6. *Турлей Е.В., Шайтан К.В., Балабаев Н.К.* // Биофизика. 2005. Т. 50. С. 1042.
7. *Rabinovich A.L., Balabaev N.K., Alinchenko M.G. et al.* // J. Chem. Phys. 2005. V. 122. 84906.
8. *Heller H., Schaefer M., Schulten K.* // J. Phys. Chem. 1993. V. 97. P. 8343.
9. *Pabst G., Rappolt M., Amenitsch H., Laggner P.* // Phys. Rev. E. 2000. V. 62. P. 4000.
10. *Isralevitz B., Gao M., Schulten K.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 2001. V. 11. P. 224.
11. *Smaby J.M., Mornsen M.M., Brockman H.L., Brown R.E.* // Biophys. J. 1997. V. 73. P. 1492.
12. *Hyslop P.A., Morel B., Sauerheber R.D.* // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 1025.
13. *Lemak A.S., Balabaev N.K.* // Mol. Simul. 1995. V. 15. P. 2231.
14. *Wang J., Cieplak P., Kollman P.A.* // J. Comp. Chem. 2000. V. 21. P. 1049.
15. *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.
16. *Nagle J.F., Zhang R., Tristram-Nagle S. et al.* // Biophys. J. 1996. V. 70. P. 1419.
17. *Wiener M.C., White S.H.* // Biophys. J. 1992. V. 61. P. 434.
18. *Reiter G., Siam M., Falkenhagen D. et al.* // Langmuir. 2002. V. 18. P. 5761.
19. *Seelig A., Seelig J.* // Biochemistry. 1977. V. 16. P. 45.
20. *Seelig J., Seelig A.* // Q. Rev. Biophys. 1980. V. 13. P. 19.
21. *Kyte J., Doolittle R.F.* // J. Mol. Biol. 1982. V. 157. P. 105.
22. *Hopp T.P., Woods K.R.* // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1981. V. 78. P. 3824.
23. *Sotomatsu-Niwa T., Ogino A.* // J. Mol. Struct. (Theochem). 1997. V. 392. P. 43.
24. *Stryer L.* Biochemistry, 4th edn. Part I, chapter 1. N.Y.: W.H. Freeman & Co., 1995.
25. *Doebler J.A.* // Cell Biol. Toxicol. 1999. V. 15. P. 279.

26. *Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Antonenko Y.N.* // *Biophys. J.* 2002. V. 82. P. 865.
27. *Williams R.J.P.* // *J. Theor. Biol.* 2002. V. 219. P. 389.
28. *Pascal S.M., Cross T.A.* // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 241. P. 431.
29. *Groot B.L., Tieleman D.P., Pohl P., Grubmuller H.* // *Biophys. J.* 2002. V. 82. P. 2934.
30. *Lindahl E., Hess B., van der Spoel D.* // *J. Mol. Model.* 2001. V. 7. P. 306.
31. *Langosch D., Thomas L., Betz H.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988. V. 85. P. 7394.
32. *Legendre P.* // *Cell. Mol. Life Sciences.* 2001. V. 58. P. 760.
33. *Yuchmanov V.E., Mandal P.K., Liu Z., Tang P., Xu Y.* // *Biochem.* 2003. V. 42. P. 3989.
34. *Keramidas A., Moorhouse A.J., French C.R., Schofield P.R., Barry P.H.* // *Biophys. J.* 2000. V. 79. P. 247.
35. *Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F., Zdebik A.A.* // *Physiol. Rev.* 2002. V. 82. P. 503.
36. *Lopez C.F., Nielsen S.O., Moore P.B., Klein M.L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. V. 101. P. 4431.
37. *Gao H., Kong Y., Cui D., Ozkan C.S.* // *Nano Lett.* 2003. V. 3. P. 471.
38. *Yeh I.-C., Hummer G.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. V. 101. P. 12177.
39. *Xie Y.H., Soh A.K.* // *Mat. Lett.* 2005. V. 59. P. 971.
40. *Fersht A.* *Enzyme structure and mechanism*, 2nd edn. N.Y.: W.H. Freeman & Co., 1985.
41. *Финкельштейн А.В., Птицын О.Б.* *Физика белка*. М.: Книжный дом «Университет», 2002.
42. *Khalatur P.G., Novikov V.V., Khokhlov A.R.* // *Phys. Rev. E.* 2003. V. 67. 051901.
43. *Ivanov V.A., Chertovich A.V., Lazutin A.A. et al.* // *Macromol. Symp.* 1999. V. 146. P. 259.
44. *Chertovich A.V., Ivanov V.A., Zavin B.G., Khokhlov A.R.* // *Macromol. Theory Simul.* 2002. V. 11. P. 751.
45. *Koronakis V.* // *FEBS Lett.* 2003. V. 555. P. 66.
46. *Levitt M.* // *Ann. Rev. Biochem.* 1997. V. 66. P. 549.
47. *Miranker A.D., Dobson C.M.* // *Curr. Opin. Struc. Biol.* 1996. V. 6. P. 31.