



УДК 577.(332+34):577.112.02

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ В МЕМБРАННОМ ОКРУЖЕНИИ.

I. МОДЕЛЬ СОЛЬВАТАЦИИ, ИМИТИРУЮЩАЯ ЛИПИДНЫЙ БИСЛОЙ

© 2000 г. Д. Е. Нольде, П. Е. Вольнский, А. С. Арсеньев, Р. Г. Ефремов[#]*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 09.04.99 г. Принята к печати 17.07.99 г.

Предлагается эффективная теоретическая модель растворителя, которая имитирует гетерогенную мембрану. Подход основан на совместном использовании атомных параметров сольватации для воды и углеводов, которые описывают, соответственно, гидратированные полярные группы и ацильные цепи липидов. Разработанная модель проверена в расчетах с неполярным 20-членным полилейцином, гидрофобным пептидом с полярными группами на концах, а также амфифильным пептидом. Конформационное пространство пептидов в присутствии мембраны исследовали методом Монте-Карло. Показано, что мембраноподобное окружение в отличие от полярного растворителя и вакуума стабилизирует α -спиральную конформацию – во всех случаях низкоэнергетические структуры имеют индекс спиральности 100%. В то же время наиболее энергетически выгодные ориентации пептидов относительно мембраны зависят от их гидрофобных свойств: неполярный полилейцин полностью погружен в бислой, гидрофобный пептид с полярными группами на концах пересекает бислой, тогда как амфифильный пептид располагается на границе раздела фаз, параллельно плоскости мембраны. Результаты расчетов хорошо согласуются с имеющимися экспериментальными данными для этих систем. В следующих работах данной серии описывается применение модели сольватации к мембраносвязанным белкам и пептидам, имеющим биологически важную функциональную активность.

Ключевые слова: конформация белка; потенциал сольватации; молекулярное моделирование; метод Монте-Карло; поверхность потенциальной энергии.

ВВЕДЕНИЕ

Понимание молекулярных механизмов встраивания пептидов и белков в липидную мембрану, а также формирования и стабилизации пространственной структуры в мембраносвязанном состоянии имеет фундаментальное значение в современной физико-химической биологии. Из-за значительных трудностей, связанных с получением экспериментальной информации о структуре мембранных белков, большой интерес представляет использование методов молекулярного моделирования. Одна из важнейших задач, рассматриваемых с помощью данных подходов, – анализ возможных конформационных состояний биомолекул в присутствии мембраны. Решение этой задачи обеспечит понимание физического механизма сворачивания мембранных белков, поможет установлению факторов, определяющих особенности их функционирования, а также будет полезно для конструирования пептидов с заданными свойствами (например, с измененной стабильнос-

тью, каналообразующей активностью и т.д.). Кроме того, методы компьютерного эксперимента позволяют исследовать ряд конформационных и термодинамических аспектов поведения биополимеров в мембране, которые в настоящее время недоступны для анализа с помощью других подходов.

Большое число экспериментальных [1–3] и теоретических [4–11] исследований взаимодействий пептид–липиды выполнено для мембраносвязанных α -спиральных структур. Интерес к их изучению вызван не только сравнительной простотой системы, но обусловлен и тем фактом, что погруженные в мембрану α -спирали в трансмембранной (ТМ) или периферической ориентации представляют собой наиболее часто встречающиеся структурные мотивы, которые функционируют либо автономно (например, пептидные антибиотики, фузионные и “якорные” пептиды и т.д.), либо в составе олигомерных комплексов (ионные каналы, токсины и т.д.) или мембранных доменов белков [12–14]. Таким образом, понимание факторов, определяющих пространственную структуру α -спирали и характер ее взаимодействия с бислоем, – важный этап на пути создания и проверки теоретических моделей, описывающих поведение белков в мембранах.

Сокращения: ТМ – трансмембранный; МД – молекулярная динамика; МК – Монте-Карло; АПС – атомные параметры сольватации.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 335-51-55; e-mail: efreinov@nmr.ru).

Основная трудность применения вычислительных методов к мембраносвязанным системам состоит в расчете взаимодействий белок-среда. Значительный прогресс, достигнутый в моделировании явно заданных гидратированных липидных бислоев методами молекулярной динамики (МД) и Монте-Карло (МК) [15], открывает принципиальную возможность исследования поведения пептидов на границе раздела мембрана-вода и в ТМ-состоянии. Результаты такого подхода опубликованы, например, в работах [6, 16]. Однако расчеты с явно заданным растворителем приводят к большому вычислительным затратам, ограничивая таким образом временную шкалу, на которой изучаются свойства пептидов и белков в мембране. При этом многие "медленные" (с характерными временами ~1–10 нс) процессы (например, формирование вторичной структуры на границе раздела фаз, встраивание полипептидной цепи в бислой, латеральная диффузия липидов и т.д.) по-прежнему остаются недоступными для анализа. Другая проблема указанных методов является фундаментальной, а именно наличие огромного числа параметров (степени свободы липидов, воды и белка), которые не заданы с требуемой точностью, увеличивает ошибку при вычислении полной свободной энергии модели. Энергетика такой системы определяется тонким балансом между взаимодействиями белок-липиды и белок-вода, каждое из которых рассчитывается путем суммирования по большому числу атомов системы. В этом случае параметры силового поля, особенно для дальних неэквивалентных взаимодействий, должны быть известны с высокой точностью. Кроме того, многие из широко используемых силовых полей, предназначенных для расчетов липидных бислоев, не совместимы с силовыми полями для белков (или не проверялись в расчетах с белками), что также ограничивает их применение в смешанных белок-липидных моделях.

Альтернативный подход заключается в использовании упрощенных описаний мембраны. При этом молекулы липидов и воды не задаются явно, а их влияние учитывается путем модификации функции потенциальной энергии белка в вакууме, как правило, с помощью добавления эмпирических потенциалов взаимодействия белок-мембрана. Такие модели вызывают особый интерес из-за их вычислительной эффективности и способности учитывать основные особенности взаимодействий белок-среда. Одними из первых указанный подход применили Эдхольм и Яниг для расчетов МД мембраносвязанного гликофорина А [4] и бактериородопсина [16–18]. Для учета влияния гидрофобного мембранного окружения каждому атому приписывали энергию, определяемую как разность его свободной энергии переноса из неполярного растворителя в воду.

Интересная попытка моделирования процессов встраивания пептидов в бислой предпринята в

работе [5]. Пептиды аппроксимировали цепочками из C^α -атомов с наборами соответствующих эффективных параметров силового поля для расчета энергии внутримолекулярных взаимодействий. Для учета гетерогенности бислоя была введена функция, характеризующая относительное содержание воды и углеводорода при изменении координаты вдоль оси, перпендикулярной плоскости мембраны. Исследование конформационного пространства осуществляли с помощью метода МК в пространстве двугранных углов, причем стартовые неупорядоченные конформации помещали вне гидрофобной области мембраны.

Полноатомная модель пептида в сочетании с неявно заданным бислоем применена в работе [8]. Сходная модель бислоя (с измененной функцией энергии и учетом электростатического потенциала на мембране) использована в работе [19]. Набор ориентаций пептида относительно мембраны получали методом МК, причем в ходе моделирования "замораживали" все внутримолекулярные степени свободы, а варьировали лишь расположение пептида как целого относительно мембраны. Конформации отбирали с использованием функции потенциальной энергии, включающей дополнительный терм, разработанный на основании свободных энергий переноса атомов в системе октанол-вода.

Расчеты, выполненные в работах [4, 5, 8, 16–19], для пептидов, структура которых в мицеллах SDS или липидных везикулах известна из эксперимента (мелиттин, магаинин-2, сегмент M2 из δ -субъединицы ацетилхолинового рецептора и др.), показали, что примененная функция энергии позволяет найти правильные ориентации пептидов относительно мембраны. В результате для перечисленных пептидов удалось смоделировать процесс формирования α -спиральной конформации на границе раздела фаз и последующее встраивание спирали в бислой.

Следует отметить и ограничения предлагаемых моделей [5, 8, 19]. Во-первых, полипептидную цепь представляют набором точечных центров (по одному на остаток), а деталями атоматных контактов и связей, которые зависят от конформации, пренебрегают. Во-вторых, гидрофобные характеристики остатков рассматривают слишком упрощенно, приписывая параметры всей боковой цепи одному центру, тогда как в реальности остатки гетерогенны по своим полярным свойствам. Для пептида длиной 20–30 остатков вносимая погрешность может быть весомой по сравнению с полной энергией системы. Еще одним недостатком таких подходов является то, что расчеты проводят с дополнительным потенциалом, способствующим образованию α -спиральной конформации (как наиболее часто встречающейся в мембраносвязанных доменах белков). В этом случае не может быть эффективно оценена энергетика переходов клубок-спираль и не рассматривается возможность существования отличных от α -спирали конформаций.

Наконец, функция свободной энергии в этих расчетах содержит члены, взятые из различных независимых источников, что вызывает вопрос об их сбалансированности как между собой, так и с вкладом внутримолекулярных взаимодействий. Насколько нам известно, детальное исследование этого вопроса до сих пор не проводилось.

Недавно мы предложили модель сольватации, имитирующую однородное неполярное мембранное окружение в конформационных расчетах пептидов и белков [7, 9–11]. При описании структуры пептида учитывали все атомы, а их конформационное пространство исследовали методом МК без каких-либо энергетических или структурных ограничений. Метод проверен для следующих пептидов: 1) короткие пептиды с известными свободными энергиями переноса бислой–вода и октанол–вода; 2) 20-членные гомополипептиды из остатков Leu, Val, Ile, Ala или Gly; 3) мембраносвязанные α -спиральные пептиды – ТМ-сегменты А и В бактериородопсина, мелиттин, магаинин-2, гидрофобный фрагмент легочного сурфактанта и др. Сравнение полученных результатов с имеющимися экспериментальными данными о структуре этих пептидов показало их хорошее соответствие друг другу. Кроме того, обнаружено, что: 1) структурные и энергетические характеристики пептидов сильно зависят от растворителя – среда, имитирующая мембрану, стабилизирует α -спиральную конформацию, в то время как полярное окружение частично разрушает ее; 2) моделирование в вакууме неадекватно воспроизводит взаимодействия белок–мембрана; 3) разработанный метод обеспечивает корректный баланс между основными энергетическими термами в выражении для свободной энергии системы; 4) в вычислительном отношении использованный нами подход гораздо более эффективен, чем моделирование в явно заданном растворителе.

В настоящей работе предлагается усовершенствованная теоретическая модель биологической мембраны, основанная на совместном использовании атомных параметров сольватации (АПС) для воды и углеводов, которые описывают гидратированные полярные группы и ацильные цепи липидов, соответственно. В данном сообщении – первой статье серии – описывается принцип метода и проводится его проверка в расчетах нескольких модельных полипептидов. В последующих работах демонстрируется применение подхода для ряда мембранных пептидов, белков и межмолекулярных комплексов с известной и неизвестной пространственной структурой.

МЕТОД РАСЧЕТА

Двухфазная модель мембраны

Потенциальную энергию системы пептид–растворитель записывали в виде:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{ЕСЕРР/2}} + E_{\text{solv}} \quad (1)$$

Здесь член $E_{\text{ЕСЕРР/2}}$ включает энергию ван-дер-ваальных и электростатических взаимодействий, энергию водородных связей и торсионных углов [20]. E_{solv} – свободная энергия сольватации, рассчитываемая по формуле:

$$E_{\text{solv}} = \sum_{i=1}^N \Delta\sigma_i S_i, \quad (2)$$

где $\Delta\sigma_i$ и S_i – соответственно АПС и площадь поверхности, доступной растворителю, i -го атома. N – число атомов, вносящих вклад в E_{solv} . Модель гетерогенной мембраны основана на комбинированном использовании АПС для неполярного (водяной пар–циклогексан, АПС^{gc}) и полярного (водяной пар–вода, АПС^{gw}) растворителей. АПС рассчитывали как описано ранее [7]. Использовали 8 АПС для следующих типов атомов: C_{aliph} , C_{ar} , C_{x} , N, O, S, N⁺, O⁻ [7, 10]. Здесь C_{aliph} и C_{ar} – атомы углерода в алифатических и ароматических группах соответственно; C_{x} – атомы углерода, связанные с гетероатомами (N, O, S и т.д., включая гетероатомы в ароматических кольцах); N и O – незаряженные атомы азота и кислорода соответственно; N⁺ и O⁻ – заряженные атомы азота и кислорода соответственно; S – атомы серы.

При построении модели сделаны следующие предположения и упрощения: 1) мембрана однородна в плоскости бислоя (XY); 2) толщина мембраны постоянна; 3) свойства мембраны не меняются при встраивании белка; 4) в центральной части бислоя и вне его влияние мембраны на белок аналогично влиянию циклогексана и воды, соответственно, т.е. на больших расстояниях от границы вода/бислой значения АПС соответствуют значениям для чистой воды и неполярного растворителя (табл. 1). Модель включает гидрофобный слой, определяемый уравнением $|z| \leq z_0$ (Z – ось, перпендикулярная плоскости мембраны, $D = 2z_0$ – толщина слоя), окруженный безграничной полярной средой (рис. 1). На границе раздела фаз применяли сглаживающую дифференцируемую функцию. Зависимость АПС от z рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{АПС}_i(z) = \begin{cases} \text{АПС}_i^{\text{mem}} - 0.5(\text{АПС}_i^{\text{mem}} - \text{АПС}_i^{\text{wat}})e^{-(|z| - z_0)/\lambda}, & \text{при } |z| < z_0 \\ \text{АПС}_i^{\text{wat}} + 0.5(\text{АПС}_i^{\text{mem}} - \text{АПС}_i^{\text{wat}})e^{-(|z| - z_0)/\lambda}, & \text{при } |z| \geq z_0. \end{cases} \quad (3)$$

Здесь $\text{АПС}_i^{\text{wat}}$ и $\text{АПС}_i^{\text{mem}}$ – АПС атомов типа i в водном и в мембранном окружении ($\text{АПС}_i^{\text{wat}} \equiv \text{АПС}_i^{\text{gw}}$; $\text{АПС}_i^{\text{mem}} \equiv \text{АПС}_i^{\text{gc}}$), соответственно (табл. 1); λ – ширина перехода на границе раздела.

В работе использовали следующие значения параметров: $\lambda = 1.5 \text{ \AA}$, $D = 2z_0 = 30 \text{ \AA}$. Функция $\text{АПС}_i(z)$ была встроена в программу FANTOM [21].

Объекты исследования

Все пептиды моделировали в полноатомном представлении. Помимо 20-членного поли-L-лейцина, использовали пептиды со следующими аминокислотными последовательностями: KLLKLLKLLKLLKLLKLLKLLKLLKLL (пептид LK) и KKKKALALALALAWALALALALAL (пептид LA). Исходные модели LK- и LA-пептидов строили в α -спиральной конформации вне гидрофобной области бислоя, а начальную структуру 20-членного полилейцина задавали случайным набором двугранных углов. Для изменения ориентации пептидов относительно бислоя в ходе МК-процедуры к ним с N-конца добавляли последовательность от 7 до 12 "фиктивных" остатков. Атомы данных остатков имели нулевые параметры силового поля и, следовательно, они не давали вклад в энергию системы. Атом N в первом из "фиктивных" остатков всегда располагали в начале системы координат (0, 0, 0), а на C-конце добавляли N-метильную группу. Поскольку сочленение пептидов с "фиктивными" остатками изменяет зарядовое состояние концевых групп (например, NH вместо NH_3^+ в изолированном пептиде), данные эффекты учитывали путем изменения типа АПС и парциальных зарядов для соответствующих атомов N или C.

Исследование конформационного пространства пептидов с помощью метода Монте-Карло

Исследование поверхности потенциальной энергии пептидов осуществляли методом МК в пространстве двугранных углов с помощью программы FANTOM [21]. Предварительно структуры подвергали энергетической минимизации: 50–100 циклов методом сопряженных градиентов. Отбор конформеров на каждом шаге проводили по критерию Метрополиса [22]. В дальнейшем, если это не оговорено особо, вычисления проводили без каких-либо наложенных ограничений. Выбор варьируемых двугранных углов осуществляли случайным образом, минимизацию структур выполняли с помощью метода сопряженных градиентов, а в качестве начальной конформации при каждом запуске брали наиболее низкоэнергетический конформер, полученный на предыдущей стадии. В случае LA- и LK-пептидов вычисления выполняли в два этапа – по 1000 МК-шагов каждый, минимизируя структуру на каждом шаге с помощью 70 итераций. При этом варьировали три и один двугранный угол соответственно. Для эффективного преодоления локальных минимумов энергии использовали схему с подстройкой температуры (T) [21]: при попадании в разные мини-

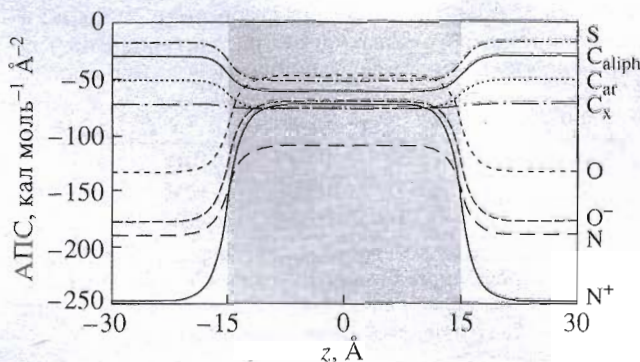


Рис. 1. Зависимость параметров сольватации различных типов атомов белка в гидратированной мембране от координаты z . Границы мембраны соответствуют $|z| \leq 15 \text{ \AA}$ (показано штриховкой), полярные области – при $z > 15 \text{ \AA}$. Типы атомных параметров сольватации: C_{aliph} , C_{ar} , C_x – атомы углерода в алифатических и ароматических группах, а также связанные с гетероатомами (O, N, S) соответственно; N, N^+ , O, O^- – незаряженные и заряженные атомы азота и кислорода соответственно; S – атомы серы.

мумы температуру выбирали равной 5 К, а при последовательном (7–10 раз) попадании в один и тот же минимум значение T изменяли скачком (на 500–1200 К) для преодоления энергетического барьера. Моделирование 20-членного полилейцина из начальной неупорядоченной структуры выполняли в следующей последовательности. Выполняли два последовательных расчета методом МК по 3000 шагов каждый, варьируя, соответственно, 15 и 10 двугранных углов и минимизируя структуру на каждом шаге с помощью 70 итераций. Температуру линейно понижали с 2000 К до 5 К. В 70% случаев для варьирования выбирали двугранные углы основной цепи. Затем применяли схему с подстрой-

Таблица 1. Атомные параметры сольватации для мембранного окружения (АПС_i^{mem}) и воды (АПС_i^{wat})

Тип атома*	АПС_i^{wat} , кал моль ⁻¹ Å ⁻²	АПС_i^{mem} , кал моль ⁻¹ Å ⁻²
C_{aliph}	20	-11
C_{ar}	-1	-26
C_x	-22	-26
S	32	-2
O	-83	3
O^-	-128	-20
N	-140	-59
N^+	-198	-22

* C_{aliph} – атомы углерода в алифатических группах; C_{ar} – атомы углерода в ароматических группах; C_x – атомы углерода, связанные с гетероатомами (O, N, S, в том числе и в ароматических кольцах); S – атомы серы; N и N^+ , O и O^- – незаряженные и заряженные атомы азота и кислорода соответственно.

Таблица 2. Гидрофобные характеристики 20-членного полилейцина, пептидов LA и LK, рассчитанные на основании анализа аминокислотной последовательности*

Пептид	$\langle H \rangle$	$ \mu_{\max} $	I_{α}	I_{β}
Полилейцин	1.06	0.022	0.11	0.08
LA**	0.83	0.062	0.16	7.39
LK	-0.22	0.853	4.64	0.17

* $\langle H \rangle$ – средний индекс гидрофобности; $|\mu_{\max}|$ – максимальный гидрофобный момент (размер окна 11 а. о.); I_{α} , I_{β} – индексы α -спирали и β -формы соответственно.

** Пептид без *N*-концевого участка KKKKK.

кой температуры (см. выше). При этом число циклов минимизации на каждом шаге выбирали от 70 до 150, а начальную температуру – 300 К. Данную схему применяли в четырех последовательных расчетах по 5000 МК-шагов каждый, варьируя по 5, 2, 1 и 1 двугранному углу, соответственно.

Во всех вычислениях, если это не оговорено особо, использовали сферическую отсечку (30 Å) для нековалентных взаимодействий. В методе МК углы ω не варьировали (за исключением углов ω “фиктивных” остатков). Конформеры рассматривали как идентичные, если суммарное отклонение их двугранных углов не превышало 1°. Остальные детали расчета можно найти в работах [7, 10–11]. Так как псевдоэнергетический член E_{solv} просто добавляли к потенциалу ESEPP/2 (вакуум), и поле $E_{\text{ECCPP/2}}$ не использовали при выводе АПС из экспериментальных данных, применение такого комбинированного потенциала может привести к двойному учету некоторых взаимодействий (например, электростатических), рассматриваемых в $E_{\text{ECCPP/2}}$ и неявно включенных в E_{solv} . Для предотвращения этого вклад дальних электростатических взаимодействий уменьшали за счет использования диэлектрической проницаемости $\epsilon = 4r$, а вклад ближних, влияющих на образование водородных связей, учитывали явно.

Анализ ориентации пептидов относительно бислоя (углы α -спиральных сегментов с норма-

лю к плоскости мембраны, координаты центра масс и т.д.) осуществляли с помощью программ, специально написанных нами для этих целей. Вторичную структуру, значения доступной поверхности и характеристики водородных связей анализировали с помощью программы DSSP [23]. Значения гидрофобного момента ($|\mu_{\max}|$) и среднего индекса гидрофобности ($\langle H \rangle$), а также индексов α -спирали (I_{α}) и β -формы (I_{β}) пептидов вычисляли как описано в работах [24, 25]. Графические изображения пространственной структуры пептидов выполняли с помощью программы MOLMOL [26]. Расчеты проводили на рабочих станциях Silicon Graphics R10000/SC O2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

20-членный полилейцин

Данный пептид не содержит полярных остатков и обладает низким значением момента гидрофобности (табл. 2). В отличие от природных ТМ-пептидов он не содержит гидрофильных участков на концах, которые обычно служат для “якоривания” полипептидной цепи в ТМ-ориентации. (Здесь и в дальнейшем термины “ТМ-ориентация” и “ТМ-состояние” служат для обозначения структур, в которых хотя бы по одному атому на *N*- и *C*-концах расположены по разные стороны от гидрофобного слоя, т.е. при $|z| > 15$ Å.) Исключения составляют полярные N–H- и C=O-группы концевых остатков, не способные образовывать водородные связи в α -спирали. Как следует из экспериментальных данных [1] и результатов теоретического анализа [10], неполярная среда стабилизирует α -спиральную конформацию остатков Leu. Таким образом, можно предположить, что в бислое полилейцин имеет α -спиральную структуру и практически полностью погружен в гидрофобную область мембраны. В то же время априори трудно сказать, какова наиболее энергетически выгодная ориентация пептида относительно бислоя.



Рис. 2. Результаты моделирования 20-членного полилейцина методом МК в среде, имитирующей мембрану. Стартовая структура до (а) и после (б) минимизации, а также конформации, полученные с интервалом 5500 МК-шагов (в–д). Неполярный слой мембраны показан серым цветом. N_{α} – число остатков в α -спиральной конформации (при наличии двух спиральных участков указано число остатков в каждом из них). *N*-Конец пептида обозначен символом “N”. Ось *Z* направлена перпендикулярно мембране.

Чтобы ответить на этот вопрос, методом МК было проведено исследование конформационного пространства полилейцина в присутствии бислоя. При этом моделирование начинали с неупорядоченной структуры, расположенной вне мембраны, и использовали модель сольватации, предложенную в настоящей работе.

Полученные результаты представлены на рис. 2–4. Контролировали следующие параметры пептида: полная энергия, вторичная структура и степень спиральности (N_α , число остатков в α -спирали), доступная растворителю поверхность, углы оси (θ) спиральных участков с осью Z , водородные связи, z -координата центра масс. Как следует из анализа расположения пептида относительно мембраны (рис. 2), уже начальная минимизация энергии системы приводит к адсорбции пептида на мембране: при этом координата z центра масс меняется от 35.5 Å в исходной конформации до 0.7 Å. В ходе последующего расчета методом МК остатки полилейцина оставались в бислое ($|z| < 15$ Å), за исключением некоторых групп концевых остатков в небольшом числе структур. Этот процесс сопровождался формированием α -спирали (рис. 2). В высокоэнергетических конформерах короткие (4–5 остатков) α -спиральные сегменты расположены вблизи N -конца пептида (рис. 3). Кроме того, в некоторых из них на участке 11–14 присутствовали остатки в конформации 3_{10} -спирали.

На рис. 4 показаны энергетические уровни и конформации наиболее стабильных структур, разбитые на несколько групп в зависимости от значений N_α и θ . Заметим, что каждое из изображенных на рис. 4 состояний соответствует локальному минимуму на гиперповерхности потенциальной энергии системы пептид–бислой. Видно, что наиболее энергетически выгодной является полностью α -спиральная конформация ($N_\alpha = 18$, концевые остатки не учитывали), целиком погруженная в неполярную область бислоя и ориентированная приблизительно параллельно ($\theta = 74^\circ$) его поверхности (состояние *a*). В то же время энергия структуры с $N_\alpha = 18$, но расположенной под углом $\sim 60^\circ$ к плоскости мембраны (состояние *b*), лишь на 1.24 ккал/моль выше. Как следует из рис. 4, энергетические границы указанных состояний перекрываются, позволяя предположить, что обе конформации могут существовать в равновесии. Ближайшими по энергии к состояниям *a* и *b* являются структуры с $N_\alpha = 17, 16$ и т.д., имеющие как транс-, так и внутрибислойную ориентацию и перекрывающиеся диапазоны энергии (не показаны). Интересно, что близкими по энергии являются и состояния с двумя α -спиральными сегментами (по 10–12 и 4–7 остатков), которые ориентированы как параллельно, так и нормально к плоскости бислоя (рис. 4). Во всех низкоэнергетических конформерах N -конец находится в неполярной области мембраны,

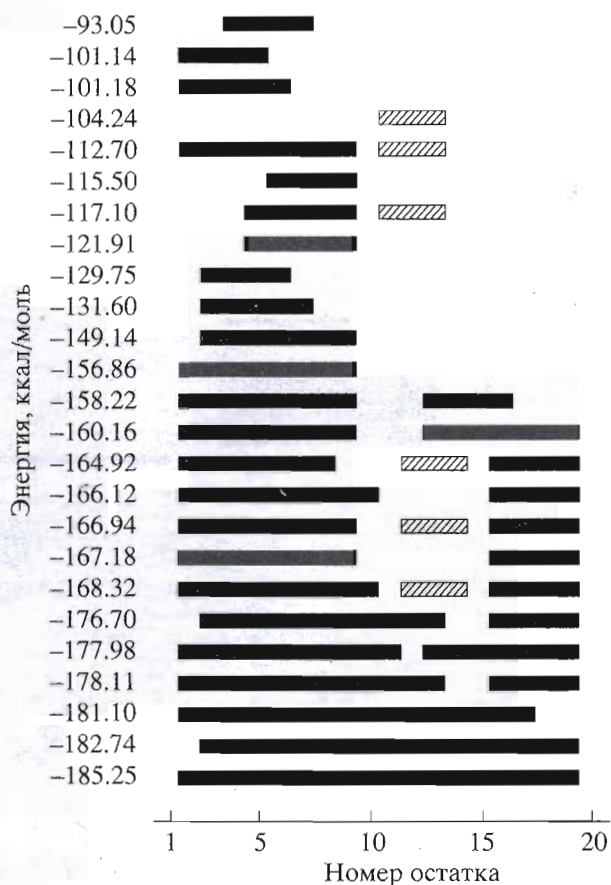


Рис. 3. Вторичная структура и энергия конформеров, найденных в результате моделирования 20-членного полилейцина с исходной неупорядоченной структурой. Показаны только конформеры с уникальным распределением участков α - (■) и 3_{10} -спирали (▨) в последовательности. Для структур с одинаковым распределением спиральных участков приведено минимальное значение энергии.

тогда как полярные атомы кислорода на C -конце в состояниях с ТМ-ориентацией (β , γ и др.) экспонированы в водную фазу. Таким образом, результаты моделирования показывают, что при взаимодействии с мембраной 20-членный полилейцин принимает α -спиральную конформацию, но при этом не имеет ярко выраженной предпочтительной ориентации относительно бислоя.

Интересно сравнить полученные данные с результатами моделирования методом МД 10-членного полилейцина на границе раздела вода–гексан, заданной явным образом [27]. В данной работе в качестве исходной структуры брали неупорядоченную конформацию, расположенную в водной фазе. В течение первых 36 нс динамики наблюдали переход пептида в область раздела вода–гексан и формирование α -спиральной конформации, причем в процессе фолдинга образовывалось и короткоживущее состояние, имеющее структуру 3_{10} -спирали. В дальнейшем пептид оставался по-

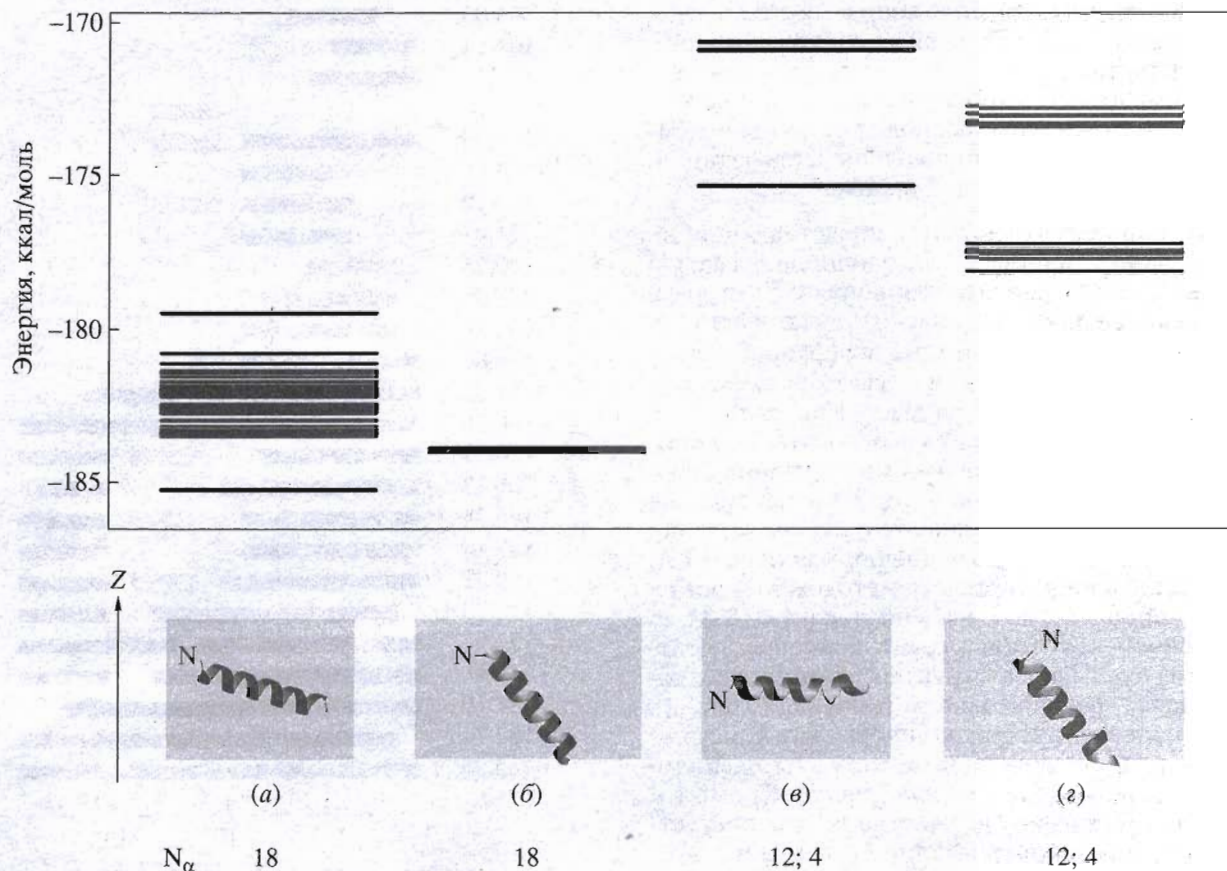


Рис. 4. Низкоэнергетические структуры 20-членного полилейцина, полученные в результате конформационного поиска методом Монте-Карло с использованием модели сольватации, имитирующей мембрану. Значения полной энергии (показаны черными линиями сверху) для различных семейств конформеров (a–d, внизу). Остальные детали как в подписи к рис. 2.

груженным в гексан, хотя и вблизи границы раздела. Декалейцин не имел ярко выраженной энергетически выгодной ориентации, а располагался как параллельно, так и нормально к плоскости мембраны. В последнем случае *N*- и *C*-концевые группы пептида были погружены, соответственно, в гексан и воду. Анализ энергий взаимодействия концевых *C=O*- и *N-H*-групп показал, что дегидратация последних существенно более выгодна. Возможно, это обуславливает встраивание гидрофобных пептидов в мембрану, начиная с *N*-конца. Данные выводы хорошо согласуются как с известными экспериментальными фактами, так и с результатами, полученными в настоящей работе с использованием модели сольватации с неявно заданным растворителем.

Пептид LA

Как и полилейцин, данный пептид в своей центральной части $\text{Ala}^6\text{-Leu}^{25}$ является неполярным и не обладает выраженной асимметрией распределения гидрофобных свойств (табл. 2). Однако в отличие от полилейцина на его *N*-конце находится

гидрофильный сегмент из пяти последовательных остатков лизина. Как правило, пептиды с такими характеристиками принимают в мембране ТМ-ориентацию [28]. Исследования поведения синтетического пептида LA в липидных бислоях с помощью твердофазной ЯМР-спектроскопии подтвердили этот вывод [29].

Исходное состояние пептида LA, а также его наиболее стабильные конформеры и значения их энергии представлены на рис. 5. Анализ полученных результатов позволяет сделать следующие выводы:

1. α -Спираль, находившаяся сначала вне гидрофобной области бислоя, быстро проникает внутрь мембраны и стабилизируется в мембраносвязанном состоянии.

2. Наиболее низкоэнергетической является α -спиральная конформация ($N_\alpha = 21$, границы спирали: остатки 3–23), имеющая от 20 до 21 водородной связи, из которых 19 – типа $O_i \rightarrow \text{HN}_{i+4}$ и 0...2 – типа $O_i \rightarrow \text{HN}_{i+3}$. Данное состояние (состояние *a* на рис. 5) характеризуется локальными минимумами энергии, расположен-

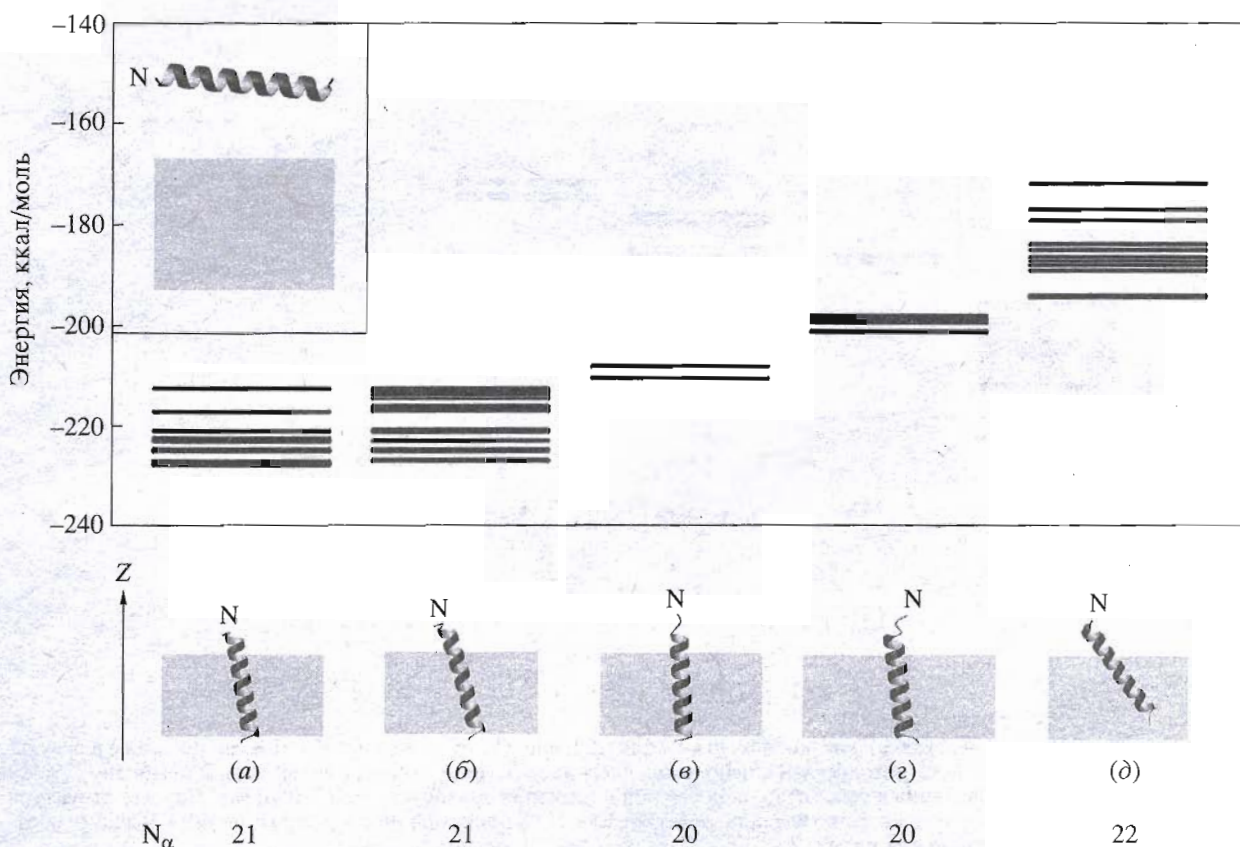


Рис. 5. Стартовая (на вставке) и низкоэнергетические (а–д, внизу) структуры пептида LA, полученные в результате конформационного поиска методом МК с использованием модели сольватации, имитирующей мембрану. Значения полной энергии для различных семейств конформеров показаны горизонтальными линиями. Остальные детали как на рис. 2.

ными в интервале $-227.54 \dots -226.92$ ккал/моль, и имеет ТМ-ориентацию (угол оси α -спирали с нормалью к плоскости мембраны $\theta \approx 9^\circ$), причем остатки Lys на N-конце и атом карбонильной группы основной цепи на C-конце находятся за пределами гидрофобного слоя мембраны, задаваемого уравнением $|z| \leq 15 \text{ \AA}$.

3. Сходные по структуре ($N_\alpha = 21$), но несколько отличающиеся по ориентации относительно бислоя ($\theta \approx 14\text{--}17^\circ$, состояние б) и глубине проникновения гидрофобной части пептида в мембрану конформации стабильны в диапазоне энергий $-226.75 \dots -195.77$ ккал/моль. Увеличение угла θ приводит к тому, что C=O-группа на C-конце пептида частично экспонирована в бислое, что повышает энергию системы.

4. Следующие по энергии низкоэнергетические стабильные состояния также имеют по одному α -спиральному участку (4–23, $N_\alpha = 20$ и 2–23, $N_\alpha = 22$, состояния в, г на рис. 5 соответственно) и характеризуются локальными минимумами энергии в диапазонах $-210.34 \dots -198.04$ ккал/моль и $-194.40 \dots -171.89$ ккал/моль. Общее число водородных связей равно 20–21 и 21 соответственно.

Повышенные значения полной энергии для этих состояний обусловлены тем, что их полярные C-концы погружены в гидрофобную область мембраны. Так, хотя структура с $N_\alpha = 20$ расположена почти перпендикулярно к плоскости мембраны ($\theta \approx 3\text{--}5^\circ$), длины ее гидрофобного α -спирального участка 6–23 недостаточно для пересечения бислоя. Конформеры же с протяженным α -спиральным сегментом ($N_\alpha = 22$) существенно отклоняются от нормали к плоскости мембраны ($\theta \approx 40^\circ$).

Интересно отметить, что из-за отсутствия периодичности распределения гидрофобных остатков в аминокислотной последовательности пептида LA, он характеризуется низким значением индекса α -спирали и очень высокой величиной индекса β -формы (табл. 2). Несмотря на это, в мембранном окружении присутствует α -спиральная конформация, а β -структурных шпилек обнаружено не было. Это объясняется тем, что неполярная среда стабилизирует α -спираль [1], тогда как образование одиночных β -структурных шпилек энергетически невыгодно, поскольку при этом остаются N–H- и C=O-группы, не участвующие в формировании водородных связей (хотя та-

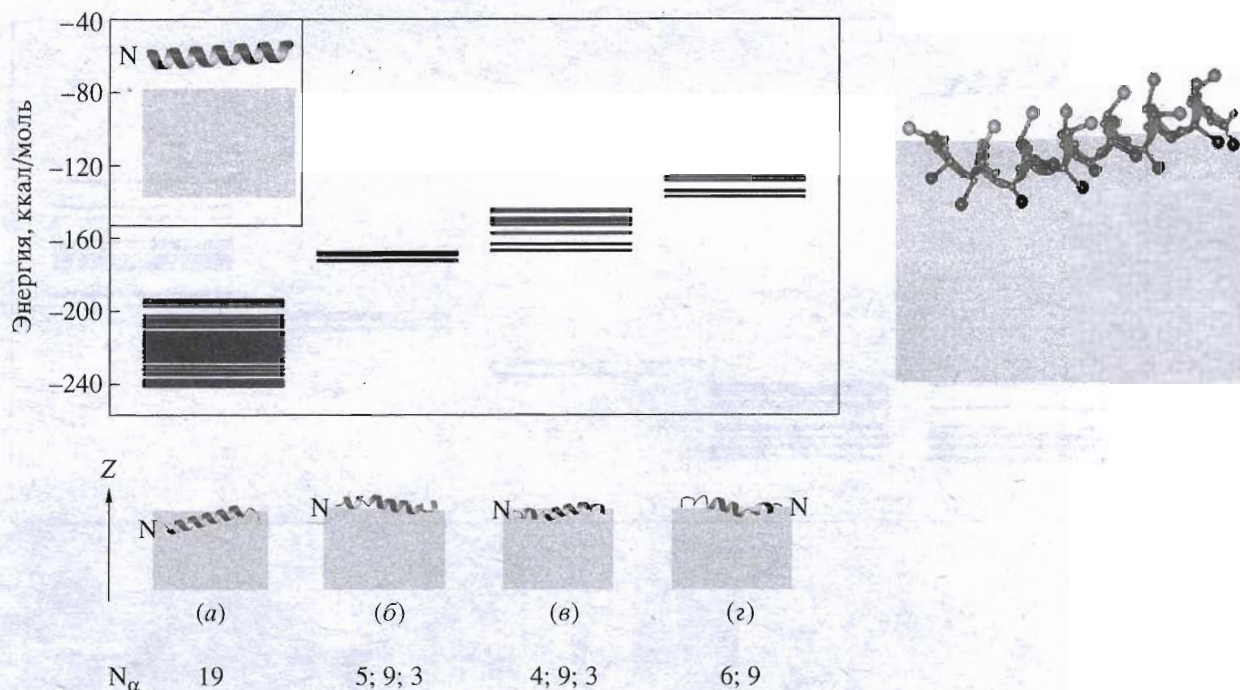


Рис. 6. Слева: стартовая (на вставке) и низкоэнергетические (а–г, внизу) структуры пептида LK, полученные в результате конформационного поиска методом МК с использованием модели сольватации, имитирующей мембрану. Значения полной энергии для различных семейств конформеров показаны горизонтальными линиями. Справа: структура наиболее стабильного конформера. Боковые цепи остатков Lys и Leu показаны светлыми и темными кружками соответственно. Остальные детали как на рис. 2.

кие структуры и могут присутствовать в водном растворе [30]).

Пептид LK

В отличие от двух гидрофобных пептидов, рассмотренных выше, последовательность пептида LK содержит полярные и неполярные остатки, чередующиеся с периодичностью, характерной для α -спирали. Гидрофобные свойства пептида (табл. 2) позволяют предположить, что на границе раздела фаз данный пептид формирует α -спираль с выраженными амфифильными свойствами. Данные спектроскопии ЯМР, полученные для пептида LK в мембранном окружении [29], в действительности показали, что пептид располагается на границе липиды–вода в α -спиральной конформации. При этом полярные боковые цепи остатков Lys экспонированы в водную фазу, а гидрофобные группы остатков Leu – в область ацильных цепей липидов. Отметим, что амфифильные пептиды, взаимодействующие с липидным бислоем, играют чрезвычайно важную роль во многих клеточных процессах. Примерами могут служить антибактериальные и фузионные пептиды, пептиды и ТМ-сегменты белков, образующие ионные каналы и т.д. Таким образом, любая теоретическая модель мембраны должна адекватно описывать поведение подобных систем в бислое. Эти соображения и обусловили выбор

пептида LK в качестве объекта для проверки предлагаемой в настоящей работе модели гетерогенной мембраны.

Результаты исследования конформационного пространства пептида методом МК представлены на рис. 6. Анализ представленных данных позволяет сделать следующие заключения:

1. Наиболее низкоэнергетические конформеры имеют α -спиральную конформацию на участке 2–20, находятся в области границы липиды–вода (среднее значение координаты z центра масс равно 15.2 Å), ориентированы почти параллельно плоскости мембраны – угол между осью спирали и нормалью к плоскости бислоя составляет $\sim 80^\circ$. При этом боковые цепи всех остатков Lys находятся в контакте со слоем воды вне мембраны, в то время как остатки Leu погружены в гидрофобную область.

2. Данные конформационные состояния существуют в широком диапазоне энергий – от –240.99 до –193.85 ккал/моль, имеют 18–21 водородных связей, из которых 17 – типа $O_i \rightarrow HN_{i+4}$ ($N_\alpha = 19$).

3. Наиболее стабильные состояния (состояние а, рис. 6) ($E < -238$ ккал/моль) характеризуются максимальной площадью поверхности, доступной растворителю и отсутствием водородных связей типа $O_i \rightarrow HN_{i+3}$.

4. Перекрывающееся с ними по энергии состояние ($E = -214.23$ ккал/моль, на рисунке не пока-

зано) имеет сходную структуру и расположение в мембране, но отличается степенью спиральности ($N_{\alpha} = 18$) и числом водородных связей.

5. Остальные состояния (состояния б-г, рис. 6) отделены по энергии от рассмотренных выше на $\Delta E \geq 15.4$ ккал/моль, имеют значения N_{α} от 9 до 17 и общее число водородных связей от 12 до 20. Кроме того, эти состояния содержат участки 3_{10} -спирали либо изломы α -спиральной структуры как на N-, так и на C-конце. Во всех случаях спиральные сегменты располагаются почти параллельно плоскости мембраны, экспонируя боковые цепи остатков Leu в неполярную, а NH_3 -группы остатков Lys – в полярную фазы бислоя.

6. В низкоэнергетических конформерах N-конец пептида заглублен в неполярную фазу бислоя, тогда как его C-конец находится вне мембраны, в “водном” окружении. Отметим, что сходные результаты получены при моделировании полилейцина с явно [27] и неявно (см. выше) заданной границей раздела фаз липиды–вода, а также для гликофорина А (см. следующую работу данной серии).

Таким образом, в соответствии с имеющимися экспериментальными данными, наиболее энергетически выгодным состоянием амфифильного пептида LK является полностью α -спиральная конформация, лежащая на поверхности мембраны, погруженная своими гидрофобными остатками в бислой и экспонирующая заряженные цепи остатков Lys во внемембранную полярную среду. Состояния с нарушенной α -спиралью или содержащие фрагменты 3_{10} -спирали гораздо менее стабильны и не конкурируют с доминирующей структурой.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе предложена гетерогенная модель биомембраны, использующая одновременно АПС для неполярного и полярного растворителей. Модель проверена в расчетах методом МК следующих систем: полностью неполярного 20-членного полилейцина, гидрофобного пептида с полярными концами (пептид LA) и амфифильного пептида LK. Низкоэнергетические конформеры всех пептидов имеют α -спиральную конформацию, в то время как их расположение относительно бислоя существенно различно: полилейцин находится преимущественно внутри мембраны, LA пересекает бислой, а пептид LK иммобилизован в области границы раздела липиды–вода, располагаясь параллельно плоскости мембраны и экспонируя боковые цепи остатков Lys в водную фазу. Полученные результаты хорошо согласуются с экспериментальными данными по структуре данных пептидов в мембраноподобных средах.

Предложенная модель гетерогенной мембраны отражает основные закономерности поведения пептидов в бислое: остатки с гидрофобными и гид-

рофильными боковыми цепями стремятся увеличить экспонированность в неполярный и полярный слои мембраны, соответственно. Согласно определению E_{solv} (выражение (2)), это приводит к понижению энергии системы и, следовательно, в низкоэнергетических состояниях гидрофобные участки пептида погружены в бислой, а гидрофильные, как правило, находятся снаружи. При этом конформация пептида и его ориентация относительно мембраны определяются тонким балансом различных энергетических термов – вандер-ваальсовы и электростатические взаимодействия, энергии сольватации и водородных связей. На гидрофобных участках пептида, проникающих в бислой, полярные N–H- и C=O-группы основной цепи стремятся образовать водородные связи. Наиболее стабильная структура в этом случае – α -спираль. Таким образом, модель позволяет описать известный из эксперимента эффект мембраноиндуцированного формирования α -спирали [1].

Моделирование с неявно заданным растворителем позволяет существенно сократить затраты машинного времени по сравнению с подходом, использующим явное описание молекул среды. Так, расчет 50 нс МД 10-членного полилейцина на границе раздела гексан–вода, заданной явным образом, потребовал в общей сложности 167.09 сут процессорного времени сервера Hewlett-Packard K-9000/133 Мгц [27]. Описанное в настоящей работе исследование методом МК конформационного пространства 20-членного полилейцина в среде, заданной неявно, потребовало 2.5 сут загрузки процессора Silicon Graphics R10000SC/195 Мгц (сравнимого по производительности с K-9000). При этом, несмотря на разницу вычислительных протоколов и степень подробности рассмотрения взаимодействий пептид–мембрана, основные выводы относительно поведения полилейцина в бислое во многом сходны (см. выше).

Несмотря на вышеуказанные достоинства предложенной модели, у нее имеется и ряд недостатков. Например, в связи с тем, что описание контакта с растворителем носит интегральный характер, она не пригодна для оценки таких тонких характеристик гидратации, как картина водородных связей пептид–растворитель, радиальные функции распределения для атомов растворителя вокруг пептида, конформация молекул окружения в первом слое сольватации и т. д. Областью применения данной модели являются такие важные задачи, как: (I) интегральная оценка относительного вклада энергии сольватации; (II) расчет вторичной структуры и пространственной ориентации относительно мембраны природных и модельных пептидов с различной полярностью аминокислотных остатков; (III) исследование процессов формирования и разрушения элементов вторичной структуры; (IV) изучение взаимодействия различных белков в мембране (например,

димеризация), а также предсказание их возможных областей контакта.

Настоящая работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 98-04-48823, 99-07-90464).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Deber C.M., Li S.-C. // *Biopolymers*. 1995. V. 37. P. 295–318.
2. Bechinger B. // *J. Mem. Biol.* 1997. V. 156. P. 197–211.
3. Hunt J.F., Earnest T.N., Bousche O., Kalghatgi K., Reilly K., Horváth C., Rothschild K.J., Engelman D.M. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 15156–15176.
4. Edholm O., Jähnig F. // *Biophys. Chem.* 1988. V. 30. P. 279–292.
5. Milik M., Skolnick J. // *Proteins*. 1993. V. 15. P. 10–25.
6. Huang P., Loew G.H. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1995. V. 12. P. 937–956.
7. Nolde D.E., Arseniev A.S., Vergoten G., Efremov R.G. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1997. V. 15. P. 1–18.
8. Ducarme P., Rahman M., Brasseur R. // *Proteins*. 1998. V. 30. P. 357–371.
9. Efremov R.G., Nolde D.E., Vergoten G., Arseniev A.S. // *Theor. Chem. Acc.* 1999. V. 101. P. 170–174.
10. Efremov R.G., Nolde D.E., Vergoten G., Arseniev A.S. // *Biophys. J.* 1999. V. 76. P. 2448–2459.
11. Efremov R.G., Nolde D.E., Vergoten G., Arseniev A.S. // *Biophys. J.* 1999. V. 76. P. 2460–2471.
12. Popot J.-L. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1993. V. 3. P. 532–540.
13. Lemmon M., Engelman D.M. // *Quart. Rev. Biophys.* 1994. V. 27. P. 157–218.
14. Sansom M.S.P. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1998. V. 8. P. 237–244.
15. Tielman D.P., Marrink S.J., Berendsen H.J.C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1331. P. 235–270.
16. Jähnig F., Edholm O. // *Z. Phys. B.* 1990. V. 78. P. 137–143.
17. Jähnig F., Edholm O. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 226. P. 837–850.
18. Edholm O., Berger O., Jähnig F. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 250. P. 94–111.
19. Gazit E., La Rocca P., Sansom M.S.P., Shai Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 12289–12294.
20. Némethy G., Pottle M.S., Sheraga H.A. // *J. Phys. Chem.* 1983. V. 87. P. 1883–1887.
21. Von Freyberg B., Braun W. // *J. Comp. Chem.* 1991. V. 12. P. 1065–1076.
22. Metropolis N., Rosenbluth A.W., Teller A.H., Teller E. // *J. Chem. Phys.* 1953. V. 21. P. 1087–1092.
23. Kabsch W., Sander C. // *Biopolymers*. 1983. V. 22. P. 2577–2637.
24. Eisenberg D., Weiss R.M., Terwilliger T.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. P. 140–144.
25. Donnelly D., Overington J.P., Ruffe S.V., Nugent J.H., Blundell T.L. // *Protein Sci.* 1993. V. 2. P. 55–70.
26. Koradi R., Billeter M., Wüthrich K. // *J. Mol. Graphics.* 1996. V. 14. P. 51–55.
27. Chipot C., Pohorille A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. V. 120. P. 11912–11924.
28. Brasseur R., Pillot T., Lins L., Vandekerckhove J., Rosseneu M. // *Trends Biochem. Sci.* 1997. V. 22. P. 167–171.
29. Bechinger B., Gierasch L.M., Montal M., Zaloff M., Opella S.J. // *Solid State NMR Spec.* 1996. V. 7. P. 185–192.
30. Munoz V., Thompson P.A., Hofrichter J., Eaton W.A. // *Nature*. 1997. V. 390. P. 196–199.

Modeling of Peptides and Proteins in Membrane Environment.

I. A Solvation Model Mimicking a Lipid Bilayer

D. E. Nolde, P. E. Volynskii, A. S. Arseniev, and R. G. Efremov[#]

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

A theoretical solvation model of peptides and proteins that mimics the heterogeneous membrane–water system was proposed. Our approach is based on the combined use of atomic parameters of solvation for water and hydrocarbons, which approximates the hydrated polar groups and acyl chains of lipids, respectively. This model was tested in simulations of several peptides: a nonpolar 20-mer polyleucine, a hydrophobic peptide with terminal polar groups, and a strongly amphiphilic peptide. The conformational space of the peptides in the presence of the membrane was studied by the Monte Carlo method. Unlike a polar solvent and vacuum, the membrane-like environment was shown to stabilize the α -helical conformation: low-energy structures have a helicity index of 100% in all cases. At the same time, the energetically most favorable orientations of the peptides relative to the membrane depend on their hydrophobic properties: nonpolar polyleucine is entirely immersed in the bilayer and the hydrophobic peptide with polar groups at the termini adopts a transbilayer orientation, whereas the amphiphilic peptide lies at the interface parallel to the membrane plane. The results of the simulations agree well with the available experimental data for these systems. In the following communications of this series, we plan to describe applications of the solvation model to membrane-bound proteins and peptides with biologically important functional activities.

Key words: protein conformation, solvation potential, molecular modeling, Monte Carlo method, potential energy surface

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 335-5155; e-mail: efremov@nmr.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 2. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.