



УДК 577.150.2

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ В МЕМБРАННОМ ОКРУЖЕНИИ. II. СТРУКТУРНЫЕ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГЛИКОФОРИНА А В БИСЛОЕ

© 2000 г. П. Е. Волынский, Д. Е. Нольде, А. С. Арсеньев, Р. Г. Ефремов<sup>#</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 09.04.99 г. Принята к печати 14.07.99 г.

С помощью описанной ранее модели сольватации (см. статью I данной серии) методом Монте-Карло проведено исследование конформационного пространства гидрофобного фрагмента гликофорина А в мембране. Моделирование выполняли с различных стартовых ориентаций: вне- и внутривислойной, частично погруженной в бислое, пронизывающей бислое. Показано, что мембрана значительно стабилизирует  $\alpha$ -спиральную конформацию в центральной гидрофобной части молекулы, которая преимущественно погружена в неполярную область бислоя. Для различных конформационных состояний рассчитаны значения энергии и охарактеризованы ориентации пептида по отношению к мембране. В зависимости от толщины бислоя структуре с минимальной энергией соответствовала либо полностью  $\alpha$ -спиральная конформация в трансбислойной ориентации, либо конформация с изломом в средней части спирали, с N- и C-концами, экспонированными на одной стороне мембраны. Трансмембранное расположение гликофорина энергетически выгодно при толщине мембраны, близкой к длине спирали в его гидрофобной части, что согласуется с наблюдаемыми в экспериментах эффектами “гидрофобного соответствия”. Обсуждаются перспективы дальнейшего уточнения модели.

*Ключевые слова:* гликофорин А; конформационный поиск; потенциал сольватации; молекулярное моделирование; метод Монте-Карло; поверхность потенциальной энергии; эффект “гидрофобного соответствия”.

### ВВЕДЕНИЕ

Основная цель настоящего цикла работ – изменение подхода с неявным описанием молекул липидов и воды для моделирования пептидов и белков в мембранном окружении. Для решения этой задачи необходима проверка модели сольватации в расчетах систем, для которых имеются экспериментальные данные о структуре в мембраноподобной среде (липидных везикулах, мицеллах SDS и т.д.). Сопоставление результатов теоретических расчетов с экспериментальными данными позволит установить, насколько адекватно модель мембраны воспроизводит реальное поведение пептида в бислое, а также даст возможность уточнить параметры модели (например, весовые коэффициенты для сольватационного члена в выражении для полной энергии системы, вклад действующих электростатических взаимодействий, протяженность области перехода между

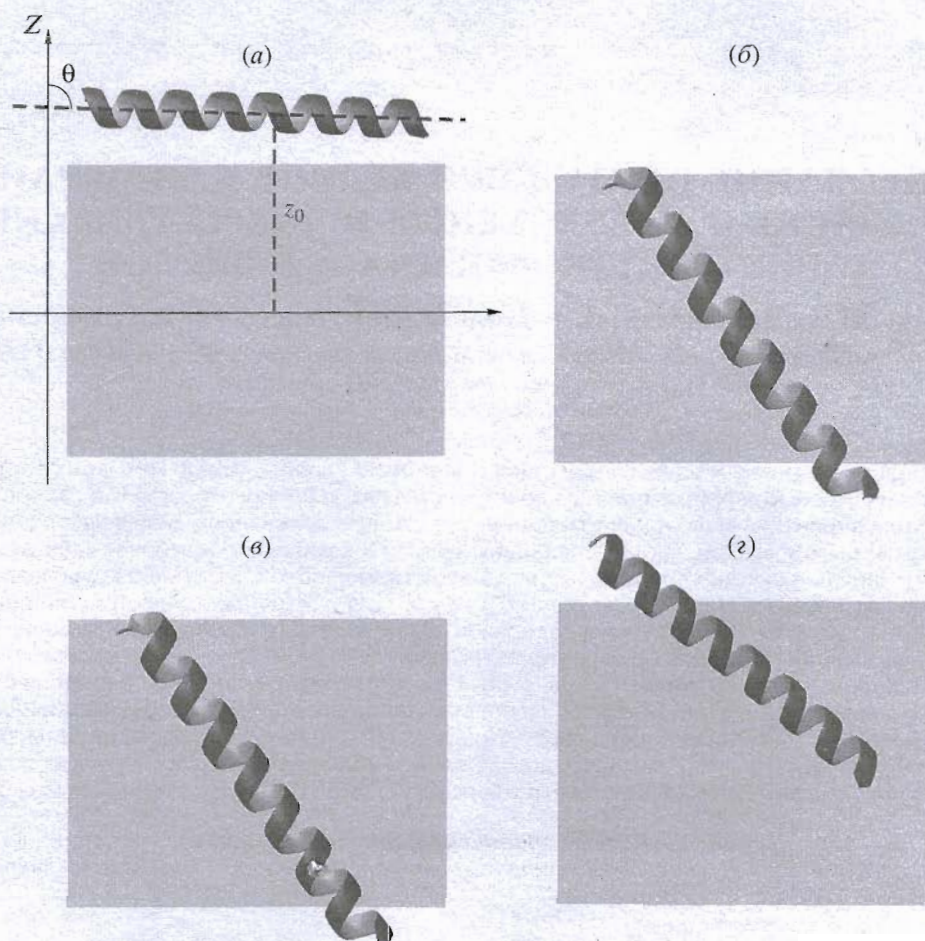
фазами и т.д.). Более подробно данные вопросы обсуждаются в наших предыдущих работах [2–4]. Как было показано в первой статье данной серии [1] на примере ряда тестовых систем, предложенная теоретическая модель трехслойной мембраны позволяет корректно описывать основные тенденции поведения пептидов в бислое: стабилизация  $\alpha$ -спиральной конформации, внутривислойная иммобилизация 20-членного полилейцина, трансмембранная (ТМ) ориентация гидрофобного пептида с полярными группами на концах, периферическое расположение амфифильного пептида.

Вместе с тем, в указанных работах не рассматривали ряд эффектов, наблюдаемых при взаимодействии пептид-липидный бислое. Например, известно [5–8], что длина гидрофобных участков полипептидной цепи, пересекающих мембрану, хорошо соответствует толщине неполярной части бислоя – так называемый эффект “гидрофобного соответствия”. В некоторых случаях было показано, что на границе раздела фаз, в области контакта пептид-липиды, толщина мембраны ( $D$ ) может меняться, подстраиваясь под размер гидрофобного сегмента пептида ( $L$ ). Так, Уэбб и др. [8] показали, что при  $D < L$  пептид способен либо изгибаться, либо располагаться под небольшим углом к плоскости бислоя. В результате его неполярная часть остается погруженной в гидрофоб-

Сообщение I см. [1].

Сокращения: GrA – гликофорин А; ТМ – трансмембранный; ТМ-GrA – GrA в трансмембранной ориентации; НР-GrA – GrA в шпилькоподобной ориентации (конформация из двух  $\alpha$ -спиралей с N- и C-концами пептида, расположенными с одной стороны бислоя).

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 335-51-55; e-mail: efremov@nmr.ru).



**Рис. 1.** Ленточные диаграммы исходных структур гидрофобного сегмента гликофорина А, использованных при исследовании конформационного пространства системы пептид-мембрана методом МК с ограничениями, стабилизирующими  $\alpha$ -спиральную конформацию.  $z_0$  – координата  $z$  центра масс пептида,  $\theta$  – угол между осью спирали и нормалью к плоскости бислоя. Параметры ( $z_0$ ,  $\theta$ ) начальных состояний: внебислового (а) 20.1 Å, 87.8°; трансмембранного (б) 0.5 Å, 36.2°; внутрибислового (в) 2.8 Å, 84.7°; частично погруженного (г) 9.0 Å, 51.5°.

ную область мембраны. С другой стороны, при ( $D - L$ )  $\sim 10$  Å встраивание пептида становится энергетически невыгодным, поскольку может достигаться лишь за счет сжатия липидного бислоя.

Большой интерес также представляет изучение альтернативных конформаций пептидов и белков в мембраносвязанном состоянии, анализ их энергетических характеристик, картины водородных связей, ориентации относительно бислоя и т.д. Во многих случаях переходы между такими состояниями, имеющими близкие значения энергии, определяют механизм функционирования мембранных пептидов и белков, например, ионных каналов, пептидов с антибактериальной, фузионной и другими типами активности.

В настоящей работе исследование указанных проблем проведено для гидрофобного ТМ-фрагмента гликофорина А (GrA), являющегося одной из наиболее простых и изученных в экспериментах систем. GrA представляет собой небольшой сialogликопротеин из мембран эритроцитов, имею-

щий единственный ТМ-участок – фрагмент 69–97 [9, 10]. Установлено, что мембраносвязанный сегмент GrA находится в  $\alpha$ -спиральной конформации, причем  $N$ -конец экспонирован на наружной стороне мембраны [11]. Для анализа поведения GrA в мембране был использован метод расчета, предложенный в предыдущей работе [1]. Кроме того, для моделирования эффектов “гидрофобного соответствия” вычисления выполняли при различных значениях толщины неполярного слоя, имитирующего область ацильных цепей липидов.

#### МЕТОД РАСЧЕТА

ТМ-участок (69–97) GrA (последовательность SEPEITLIFGVMAGVIGTPLLISYGIRR) [9] был сконструирован в исходной  $\alpha$ -спиральной конформации. Для изменения ориентации пептида во время моделирования методом Монте-Карло (МК) к  $N$ -концу GrA был “прикреплен” фрагмент из 12 “фиктивных” остатков. Атомам данных ос-

татков не приписывали 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 C-концевую карбоксильную группу (-COOH) заменяли на N-метильную (-CONHCH<sub>3</sub>). Расчеты выполняли с различных стартовых ориентаций GrA относительно бислоя: транс- и внутривислойной, частично погруженной в бислой, вне бислоя (рис. 1). Конформационное пространство пептида исследовали методом МК в пространстве двугранных углов без каких-либо ограничений. При этом использовали схему с подстройкой температуры [12] и варьировали от одного до пяти двугранных углов (кроме  $\omega$ ). На участках с "фиктивными" остатками варьировали все двугранные углы. На каждом МК-шаге полученную структуру минимизировали с помощью 150 итераций методом сопряженных градиентов. Расчеты проводили при следующих значениях толщины мембраны *D*: 25, 30, 32, 34, 35, 38, 40 и 45 Å.

Выполняли две серии вычислений – с ограничениями, препятствующими дестабилизации  $\alpha$ -спиральной конформации, и без них. В первом случае фиксировали двугранные углы основной цепи на участке Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>28</sup> (здесь и в дальнейшем нумерация аминокислотных остатков GrA соответствует последовательности пептида, использованного в расчетах). Число МК-итераций выбрали равным 1000 и 5000 соответственно. Остальные детали вычислений описаны в работах [1–3]. Анализ конформаций и ориентаций пептида относительно бислоя (степень спиральности, система водородных связей, углы  $\theta$  осей  $\alpha$ -спиральных сегментов с нормалью к плоскости мембраны (ось Z), координаты центра масс и т.д.) осуществляли с помощью программ, специально написанных для этих целей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Исследование конформационного пространства GrA с ограничениями, стабилизирующими  $\alpha$ -спиральную конформацию.** Данный протокол расчета позволяет осуществлять эффективный быстрый поиск оптимальных (низкоэнергетических) ориентаций  $\alpha$ -спирали относительно мембраны. На рис. 2 показаны значения полной энергии системы пептид-бислой, координаты *z* центра масс GrA и углы, образуемые спиральным участком Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>28</sup> с нормалью к плоскости мембраны. Представленные данные относятся к ансамблю минимизированных структур, полученных в результате исследования конформационного пространства системы GrA в мембране методом МК. Видно (рис. 2), что состояниям с минимальной энергией соответствует только TM-ориентация пептида ( $z \approx 1-2$  Å;  $\theta \approx 25-30^\circ$ ), причем указанный результат был получен для всех стартовых ориентаций GrA (здесь и в дальнейшем термины

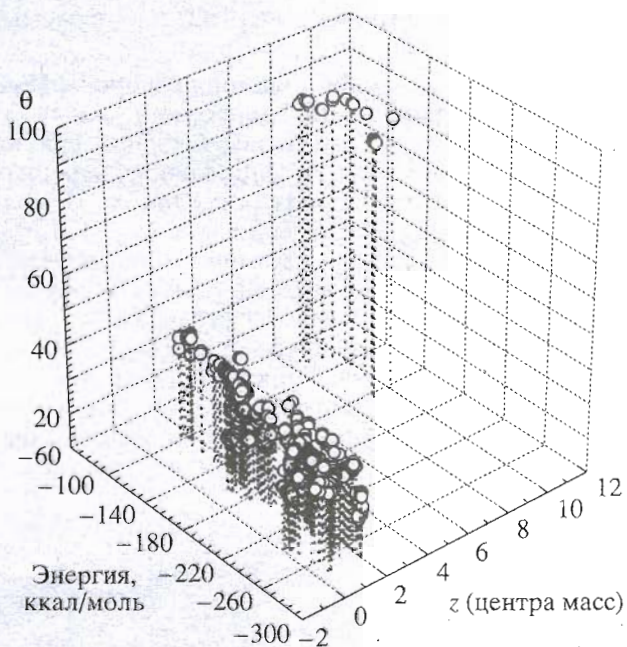


Рис. 2. Результаты расчета методом Монте-Карло гидрофобного 69–97-сегмента гликофорина А в присутствии мембраны и с ограничениями, стабилизирующими  $\alpha$ -спиральную конформацию. На рисунке представлены полная энергия состояний, координата *z* их центра масс и угол  $\theta$  между осью спирали и нормалью к плоскости бислоя.

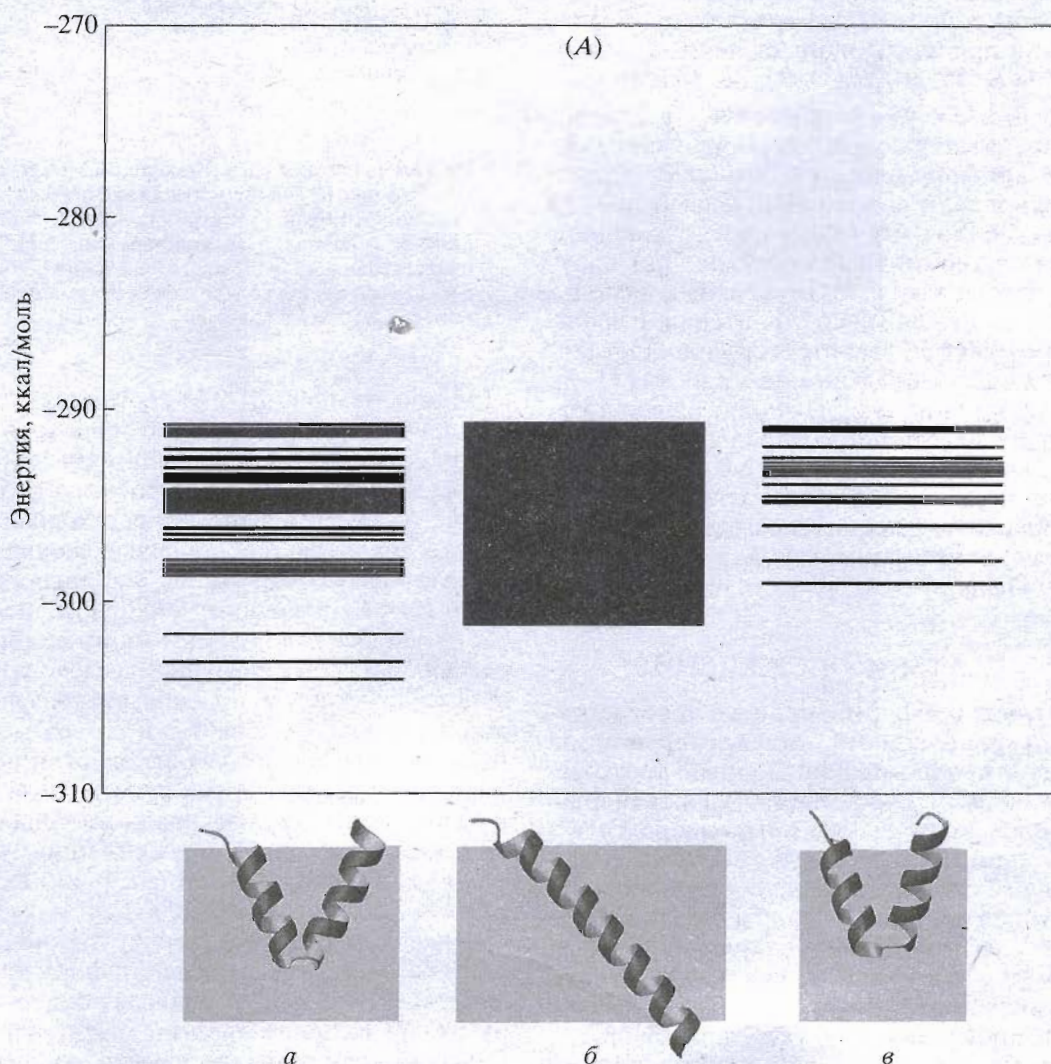
“TM-ориентация” и “TM-состояние” служат для обозначения структур, в которых хотя бы по одному атому на N- и C-концах расположены по разные стороны от гидрофобного слоя, т.е. при  $|z| < 15$  Å [1]). В случаях, когда исходная структура была в значительной степени экспонирована в полярную фазу (рис. 1а, г), наблюдали быстрое (~10–20 МК-итераций) смещение центральной части пептида в неполярную зону мембраны, а последующий поиск позволял исследовать возможные способы расположения пептида по отношению к границе раздела фаз и уточнить конформации боковых цепей. Анализ энергии полученных конформеров дает возможность сделать следующие выводы: 1) TM- $\alpha$ -спираль стабильна (находится в локальных энергетических минимумах) в широком диапазоне энергии ( $\Delta E \sim 180$  ккал/моль) – от –274.3 до –96.7 ккал/моль. При этом данные состояния отличаются степенью экспонированности остатков в бислой, а также конформациями боковых цепей, что и обуславливает большую величину  $\Delta E$ . 2) Разность энергии между наиболее стабильным конформером, пересекающим мембрану (TM-состояние) и состоянием, не являющимся трансбислойным (не-TM-состояние), составляет около 130 ккал/моль. 3) Энергия не-TM-состояний находится в диапазоне от –143.8 до –75.9 ккал/моль. 4) Лишь несколько подобных состояний имеют значения энергии ( $E = -143.8 \dots -96.7$  ккал/моль),

попадающие в интервал энергий, наблюдаемых для ТМ-состояний.

**Исследование конформационного пространства GrA без ограничений.** Конформационный поиск, описанный выше, позволяет эффективно исследовать поверхность потенциальной энергии  $\alpha$ -спирали GrA в различных ориентациях относительно границы раздела липиды/вода – ТМ-ориентации, в ориентации, частично погруженной в бислой, и т.д. В то же время в рамках этого приближения не рассматривается ряд факторов, важных для белок-мембранного взаимодействия, например, формирование и разрушение вторичной структуры, присутствие шпилькообразных состояний и т.д. Для изучения подобных явлений был проведен анализ конформационного простран-

ства GrA в присутствии мембраны методом МК без ограничений. Кроме того, в расчетах варьировали толщину мембраны. Найденные в результате структуры анализировали с использованием следующих критериев: полная энергия и ее компоненты, вторичная структура и степень спиральности ( $N_{\alpha}$ , число остатков в  $\alpha$ -спирали), доступная растворителю поверхность, углы осей спиральных участков с осью Z, система водородных связей, z-координата центра масс. Конформации, полученные с различных стартовых ориентаций, но при одинаковой толщине мембраны, рассматривали как одну группу данных.

Результаты расчетов со значениями  $D = 25, 30$  и  $45 \text{ \AA}$  представлены на рис. 3. На этом рисунке показаны энергетические уровни и конформации



**Рис. 3.** Низкоэнергетические структуры, полученные в результате моделирования гидрофобного сегмента гликофорина А методом Монте-Карло без ограничений, с использованием модели сольватации, имитирующей мембрану различной толщины – 25 (А), 30 (В), 45 Å (С). Значения полной энергии для различных классов состояний, сгруппированных по числу спиральных сегментов и их длине. Внизу: ленточные диаграммы конформеров (построенные для структуры с минимальной энергией в соответствующей группе). Длина спиральных сегментов составляет 26 (А-б, Б-а, В-г), 25 (Б-б), 12/13 (А-а, Б-г), 12/12 (А-в, Б-в), 5/20 (Б-а), 5/19 (Б-б), 6/19 (Б-в) остатков. Гидрофобная часть бислоя выделена серым цветом.

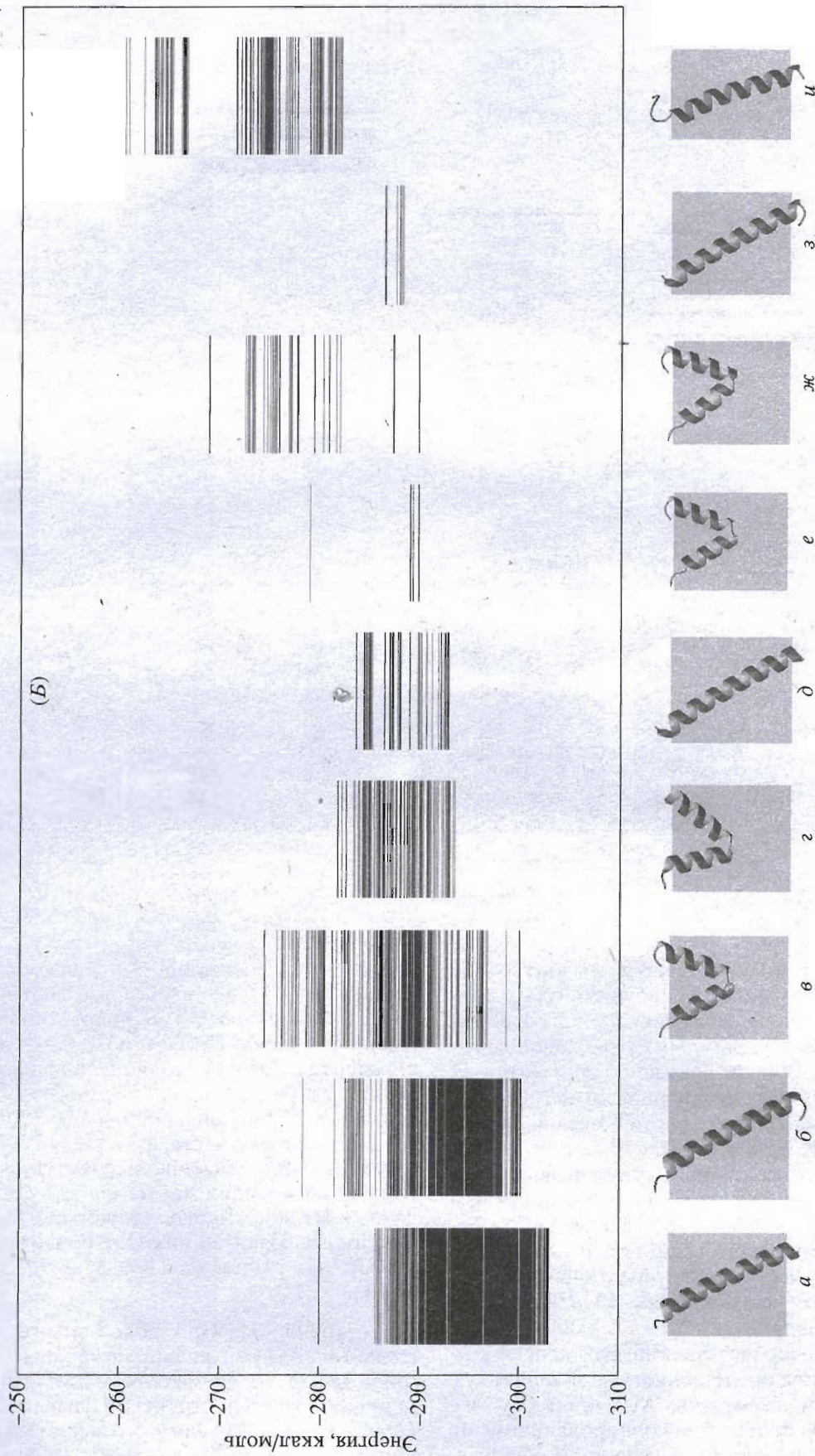


Рис. 3. Продолжение.

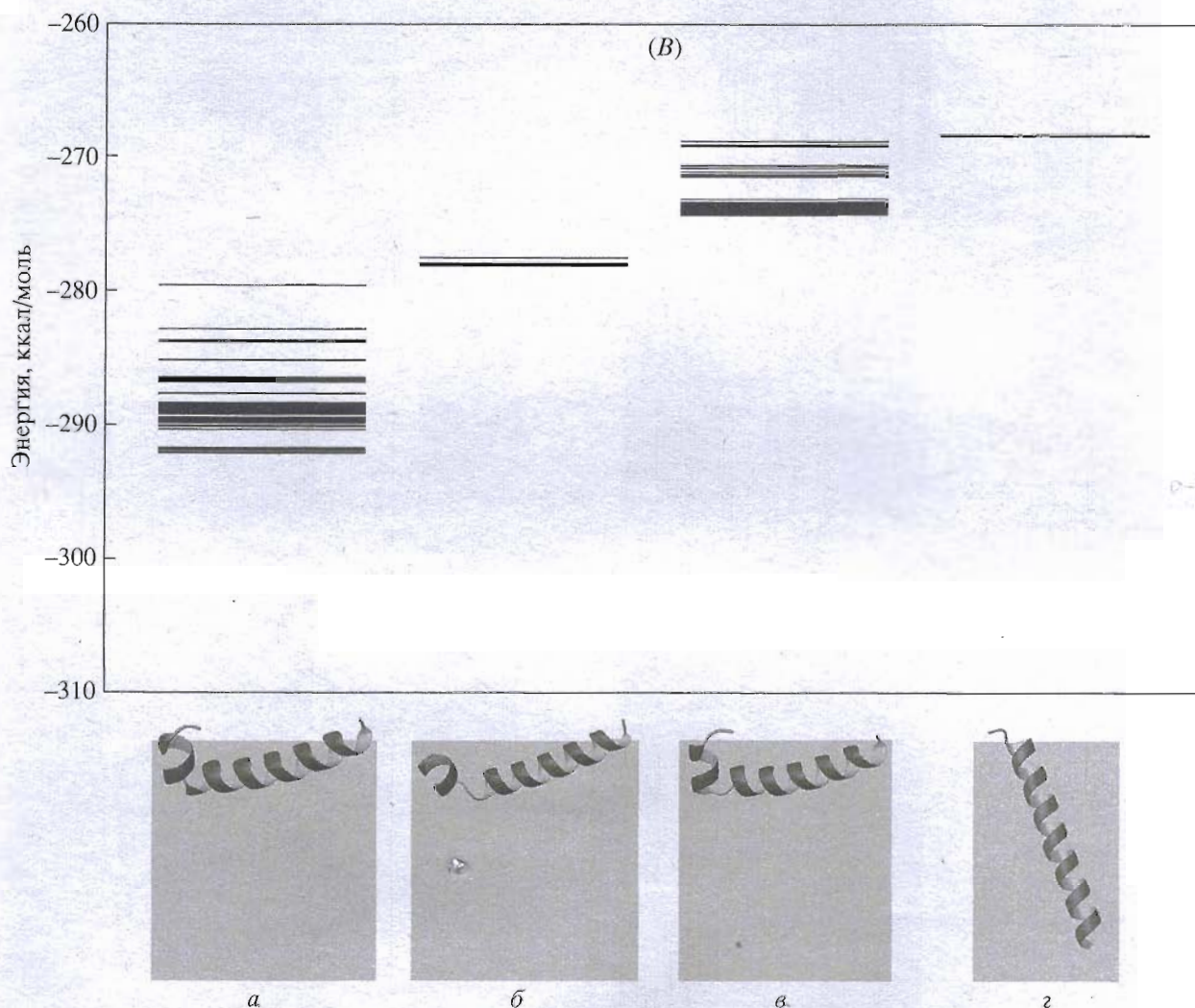


Рис. 3. Окончание.

наиболее стабильных структур, разбитых на группы с использованием вышеупомянутых критериев. Данные вычислений при  $D = 32, 34, 35, 38$  и  $40 \text{ \AA}$  не приведены. Заметим, что каждое из состояний, изображенных на рис. 3, соответствует локальному минимуму на гиперповерхности потенциальной энергии системы пептид-бислоя. Видно, что при толщине мембраны  $D = 30 \text{ \AA}$  (рис. 3Б) наиболее стабильными конформерами являются состояния *a* и *б* с одним протяженным  $\alpha$ -спиральным участком ( $N_\alpha = 26$  и  $25$  соответственно) в ТМ-ориентации. Разности энергий ( $\Delta E$ ) между структурой с минимальной энергией в группе *a* и ближайшей структурой, не являющейся ТМ- $\alpha$ -спиралью (группа *в*), составляют  $3.0, 2.0$  и  $2.5$  ккал/моль для  $D = 30, 32, 35 \text{ \AA}$ , соответственно. Это второе стабильное состояние представляет собой шпильку с изломом спирали на остатках Ala<sup>14</sup> и/или Gly<sup>15</sup> и с N- и C-концами пептида, экспонированными на одной стороне бислоя (в последующем обсужде-

нии для этих состояний будут использованы сокращения ТМ-ГрА и НР-ГрА соответственно). Как следует из рис. 3А, Б, энергетические границы конформеров ТМ-ГрА и НР-ГрА сильно перекрываются. Это позволяет предположить, что данные состояния могут существовать в равновесии. Их доминирующая роль наглядно проиллюстрирована на рис. 4, где представлена гистограмма распределения найденных структур вдоль транс-бислоевой координаты их центра масс (координата  $z$ ). Видно, что существуют два выраженных максимума: один из них ( $z \approx 0 \text{ \AA}$ ) соответствует ТМ-ГрА-, а второй ( $z \approx 8-9 \text{ \AA}$ ) – НР-ГрА-состояниям.

Состояние ТМ-ГрА более энергетически выгодно только при толщине мембраны  $30 \leq D \leq 35 \text{ \AA}$  (рис. 3Б), в то время как вне этого диапазона шпилькоподобная структура незначительно (при  $D = 25 \text{ \AA}$ , рис. 3А) или существенно (при  $D = 45 \text{ \AA}$ , рис. 3В) более стабильна. Средние значения угла

между спиралью ТМ-ГрА и осью  $Z$  равны: 42.9, 29.0, 25.4, 19.8, 16.9, 13.3, 20.4° для  $D = 25, 30, 32, 34, 35, 38, 40$  Å, соответственно. Отметим, что длина идеальной  $\alpha$ -спирали, содержащей 25/26 остатков, составляет 37.5–39 Å. Таким образом, можно предположить, что гидрофобная спираль ТМ-ГрА (Pro<sup>3</sup>–Arg<sup>28</sup>) подстраивается под толщину мембраны – подобный эффект регистрировали в экспериментах и он известен как эффект “гидрофобного соответствия” [5, 7, 8]. В случае тонкой мембраны ( $D < 30$  Å) длина спирали ТМ-ГрА слишком велика, и она предпочитает пронизывать мембрану в ориентации, в которой ее ось сильно отклонена от оси  $Z$ :  $\theta \approx 40^\circ$  (рис. 3А). Оптимальное соответствие между длиной неполярного фрагмента ТМ-ГрА и толщиной мембраны наблюдается при  $D = 38$  Å. В случае толстой мембраны ( $D \geq 40$  Å) наиболее энергетически выгодными являются состояния НР-ГрА с гидрофильными  $N$ - и  $C$ -концами, экспонированными в полярную среду (рис. 3В). При этом состояние, в котором  $\alpha$ -спираль расположена нормально к плоскости бислоя (рис. 3В–2), имеет энергию на ~23 ккал/моль выше, чем наиболее стабильное шпилькоподобное состояние. Дальнейшее увеличение  $D$  не приводит к существенному изменению результатов, поскольку длина спирали более не является достаточной для пересечения мембраны. Этот результат также демонстрирует, что изменение ориентации ТМ-спирали относительно плоскости мембраны энергетически более выгодно, чем альтернативные процессы – сохранение перпендикулярной ориентации за счет частичного разрушения концов спирали либо проникновения полярных остатков в бислой. Данные наблюдения согласуются с общей тенденцией поведения  $\alpha$ -спиральных пептидов в мембране с варьируемой толщиной бислоя [8].

Существование двух различных групп состояний с близкими значениями энергии, а именно состояний ТМ-ГрА и НР-ГрА, требует более детального изучения их структуры, так как экспериментальные данные показывают, что ГрА пересекает мембрану как ТМ- $\alpha$ -спираль [13]. Анализ низкоэнергетических конформеров, полученных при  $D = 30$  Å, позволяет сделать следующие заключения: 1) помимо водородных связей типа  $O_i \rightarrow HN_{i+4}$ , характерных для  $\alpha$ -спирали, ТМ-ГрА стабилизирован тремя дополнительными водородными связями между атомами боковых цепей и основной цепи (Thr<sup>6</sup> : H <sup>$\eta$ 1</sup>...O : Glu<sup>2</sup>, Thr<sup>19</sup> : H <sup>$\eta$ 1</sup>...O : Gly<sup>15</sup>, Ser<sup>24</sup> : H <sup>$\eta$ 1</sup>...O : Ile<sup>20</sup>); 2) НР-ГрА имеет две водородные связи типа боковая цепь – основная цепь (Thr<sup>6</sup> : H <sup>$\eta$ 1</sup>...O : Pro<sup>3</sup>, Ser<sup>24</sup> : H <sup>$\eta$ 1</sup>...O : Ile<sup>20</sup>) и одну водородную связь между боковыми цепями (Arg<sup>29</sup> : H <sup>$\eta$ 11</sup>...O<sup>e</sup> : Glu<sup>4</sup>), соединяющую внеклеточные концы. Способность протонов гидроксильных групп боковых цепей остатков Thr и Ser в мембранном окружении образовывать

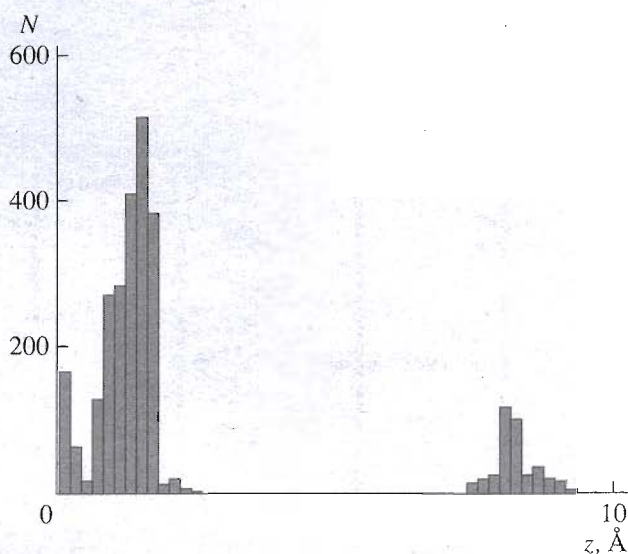
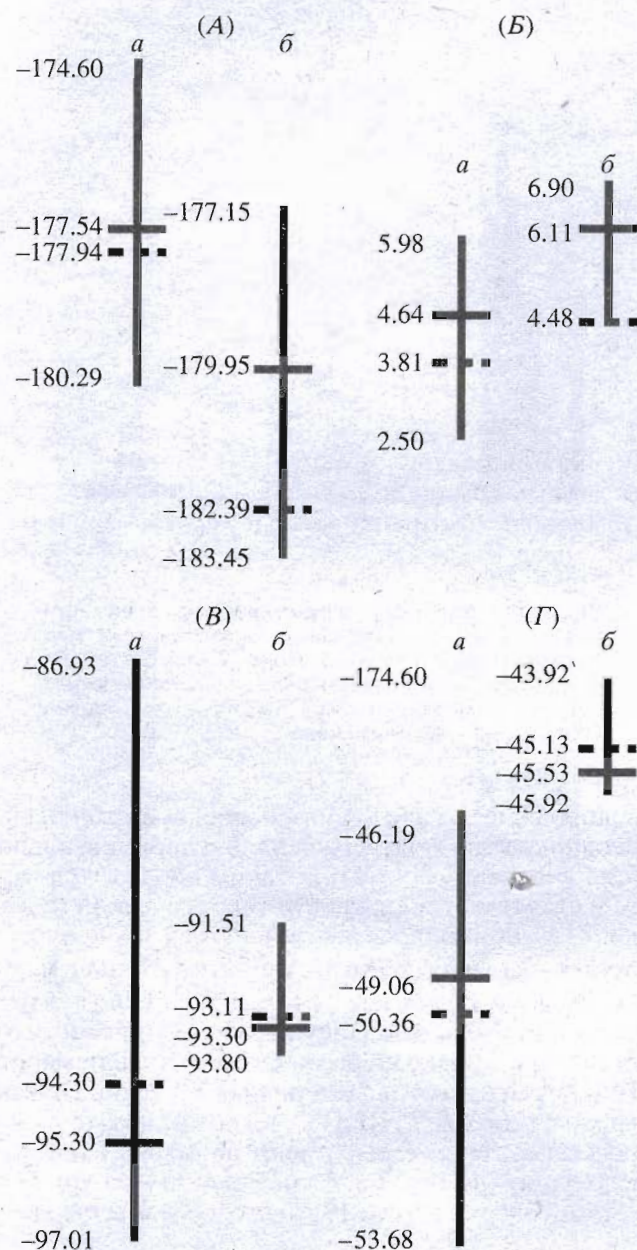


Рис. 4. Гистограмма распределения состояний  $N$ , полученных при моделировании гидрофобного сегмента гликофорина А методом Монте-Карло без ограничений, с использованием модели сольватации, имитирующей мембрану в соответствии со значениями координаты  $z$  их центра масс.

водородные связи с атомами основной цепи была неоднократно подтверждена экспериментально (см., например, [14–15]) и, таким образом, свидетельствует об адекватности теоретической модели. Как упоминалось ранее, при всех значениях  $D$  остатки на участке Pro<sup>3</sup> – Arg<sup>28</sup> погружены в мембрану, в то время как остатки Ser<sup>1</sup>, Glu<sup>2</sup> и Arg<sup>29</sup> экспонированы в полярную фазу. Интересно, что структура низкоэнергетических конформеров НР-ГрА меняется для различных значений  $D$ . Как видно из рис. 3Б, В, НР-ГрА содержит два спиральных сегмента, которые имеют примерно одинаковую длину (по 11–13 а. о.) при  $D = 30$  Å, а при  $D = 45$  Å содержат 5–6 и 19–20 а. о. соответственно.

На рис. 5 показаны значения вкладов различных внутримолекулярных взаимодействий (кроме торсионных, величина которых примерно постоянна) в полную энергию состояний ТМ-ГрА и НР-ГрА ( $D = 32$  Å). Данные приведены как для набора структур, так и для состояний с минимальной энергией, полученных в результате моделирования методом МК. Видно, что в случае НР-ГрА энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий как в среднем по набору, так и для наиболее стабильных структур ниже, чем для ТМ-ГрА. Это объясняется благоприятными контактами боковых цепей остатков на участках 4–11 и 18–29, сближенных в пространстве за счет излома  $\alpha$ -спирали. В то же время остальные компоненты энергии (электростатическая, сольватации и водородных связей ( $E_{\text{elect}}$ ,  $E_{\text{solv}}$ ,  $E_{\text{H-bond}}$  соответственно)) НР-ГрА выше, чем в ТМ-ГрА. Для электростатических



**Рис. 5.** Вклады внутримолекулярных взаимодействий (ккал/моль) в полную энергию состояний ТМ-ГрА (а) и НР-ГрА (б). Ван-дер-ваальсовы (А), электростатические (Б) взаимодействия, энергия сольватации (В) и водородных связей (Г). Средние значения для набора структур и значения для состояний с минимальной энергией, полученных в результате моделирования методом МК, показаны сплошными и пунктирными горизонтальными линиями, соответственно.

взаимодействий разница ( $E_{\text{ТМ-ГрА}} - E_{\text{НР-ГрА}}$ ) средних значений и значений для наиболее низкоэнергетических структур составляет  $-1.47$  и  $-0.71$  ккал/моль соответственно. В случае  $E_{\text{solv}}$  и  $E_{\text{H-bond}}$  эти числа равны  $-2.00$ ;  $-1.19$  и  $-3.53$ ;  $-5.23$  ккал/моль соответственно. Как следует из этих данных, основной вклад в обеспечение боль-

шей стабильности состояния ТМ-ГрА по отношению к НР-ГрА вносит  $E_{\text{H-bond}}$ . Причиной служит наличие двух “лишних” водородных связей типа  $O_i \rightarrow HN_{i+4}$ : ТМ-ГрА содержит 24 водородные связи типа  $O_i \rightarrow HN_{i+4}$  и 3 – между атомами основной и боковых цепей, а НР-ГрА – 21 связь типа  $O_i \rightarrow HN_{i+4}$ , 1 – типа  $O_i \rightarrow HN_{i+2}$  и 3 – с участием боковых цепей остатков. Кроме того, более благоприятным для ТМ-ориентации пептида является и взаимодействие с мембраной ( $E_{\text{solv}}$ ): несмотря на то, что для обеих альтернативных структур диапазоны  $E_{\text{solv}}$  перекрываются (рис. 5Б), их значения для наиболее стабильных состояний и средние меньше для ТМ-ГрА. Это состояние характеризуется и большей доступностью окружению – площадь доступной поверхности составляет  $\sim 3130 \text{ \AA}^2$  ( $\sim 2960 \text{ \AA}^2$  в НР-ГрА).

Таким образом, в согласии с экспериментальными данными, в случае оптимального “гидрофобного соответствия” между толщиной мембраны и длиной неполярного участка ГрА наиболее энергетически выгодной является полностью  $\alpha$ -спиральная структура, пересекающая бислоем. В то же время расчеты с предлагаемой моделью сольватации показывают, что возможно существование и альтернативного, не-ТМ-состояния, отличающегося по энергии лишь на 4–5 кТ от “нативного” (т.е. наблюдаемого в эксперименте) состояния и, таким образом, способного также присутствовать в равновесии. Данный результат противоречит экспериментальным фактам – при встраивании ГрА в мицеллы SDS или искусственные мембраны [9, 11] был сделан вывод о ТМ-ориентации пептида. Мы полагаем, что указанное несоответствие может объясняться следующими причинами: 1) Ограниченная чувствительность экспериментальных методов, использованных до 1985 г. [11], не позволила выявить присутствие шпилькообразных структур – так, в недавних исследованиях ряда других пептидов наблюдали оба подобных состояния [8]. 2) Модель мембраны является симметричной, в то время как реальным системам свойственна асимметрия, выражающаяся в наличии трансмембранного электростатического потенциала, в различных концентрациях ионов внутри и снаружи клетки и т.д. В частности, одно из следствий такой асимметрии – неравномерное распределение отрицательно и положительно заряженных остатков вблизи цитоплазматической и протоплазматической поверхностей (так называемое правило “положительные остатки – внутри клетки” [16]). Для ГрА, имеющего по два отрицательно ( $\text{Glu}^2$  и  $\text{Glu}^4$ ) и два положительно ( $\text{Arg}^{28}$  и  $\text{Arg}^{29}$ ) заряженных остатка на N- и C-концах, соответственно, учет асимметрии мембраны представляется особенно важным. По-видимому, это будет способствовать повышению стабильности ТМ-состояний. Так, например, при наличии



трансмембранного электрического потенциала, экспонированность на одной стороне бислоя групп с зарядами противоположных знаков (что характерно для HP-GrA-состояний) будет энергетически невыгодной.

Предложенный в настоящей работе подход – первый шаг на пути создания реалистичной и эффективной в вычислительном отношении модели бислоя, предназначенной для моделирования поведения мембраносвязанных белков и пептидов. Так, помимо асимметрии свойств на внутренней и наружной поверхности, природные мембраны характеризуются гетерогенностью липидного состава, определенным радиусом кривизны, механическими свойствами и т.д. Следовательно, дальнейшее совершенствование модели будет направлено на учет этих параметров и их проверку в расчетах более сложных биологических систем.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты настоящей работы могут быть сформулированы следующим образом:

1). Трехслойная модель мембраны с неявно заданными молекулами липидов и воды позволяет правильно предсказать трансбислоюю ориентацию и  $\alpha$ -спиральную структуру гликофорина А – соответствующие состояния имеют наиболее низкие значения энергии в бислое. В результате исследования методом МК конформационного пространства пептида в присутствии мембраны были охарактеризованы и отличающиеся по структуре, но близкие по энергии состояния (например, шпилька из двух  $\alpha$ -спиралей с N- и C-концами, экспонированными в воду).

2). Применение модели сольватации с использованием ограничений, стабилизирующих  $\alpha$ -спиральную структуру, дает возможность проводить быстрый МК-поиск возможных ориентаций спирального пептида относительно границы раздела фаз. Данный подход перспективен при оценке геометрии связывания с бислоем тех пептидов, для которых имеются данные, подтверждающие наличие спиральной структуры в мембранном окружении.

3). Помимо корректного предсказания низкоэнергетических структур, метод конформационного поиска без ограничений, т.е. с полностью подвижной молекулой пептида в полноатомном представлении, позволяет оценить ряд факторов, важных для взаимодействия белок-липиды: формирование и разрушение вторичной структуры, замыкание водородных связей между остатками, далеко отстоящими в полипептидной цепи, а также роль эффектов “гидрофобного соответствия/несоответствия”. Так, было показано, что “нативное” (т.е. наблюдаемое в эксперименте)

TM- $\alpha$ -спиральное состояние GrA наиболее стабильно по сравнению с другими состояниями при совпадении длины гидрофобного участка пептида с толщиной мембраны.

В мембранном окружении гликофорин образует стабильные гомодимеры, пространственная структура которых в мицеллах SDS была недавно установлена с помощью спектроскопии ЯМР [17]. Исследование молекулярных механизмов олигомеризации пептидов и белков в липидном бислое является одним из наиболее важных направлений современной биофизики мембранных систем, поскольку решение данной проблемы будет способствовать пониманию процессов сборки и функционирования мембранных белков и белок-белковых комплексов. Поэтому логическим продолжением настоящей работы является применение модели гетерогенной мембраны для теоретического моделирования димеризации TM-сегментов GrA. Этой проблеме посвящена часть III данной серии статей, которая готовится к публикации. Кроме того, в настоящее время проводится дальнейшее детальное тестирование модели в расчетах различных мембраносвязанных пептидов. Разрабатывается также усовершенствованная модель мембраны, учитывающая TM-электрический потенциал и влияние внешнего электромагнитного поля на белок-мембранное взаимодействие.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нольде Д.Е., Вольтский П.Е., Арсеньев А.С., Ефремов Р.Г. // Биооргани. химия. 2000. Т. 26. С. 130–140.
2. Nolde D.E., Arseniev A.S., Vergoten G., Efremov R.G. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1997. V. 15. P. 1–18.
3. Efremov R.G., Nolde D.E., Vergoten G., Arseniev A.S. // Biophys. J. 1999. V. 76. P. 2248–2459.
4. Efremov R.G., Nolde D.E., Vergoten G., Arseniev A.S. // Biophys. J. 1999. V. 76. P. 2460–2471.
5. Fattal D.R., Ben-Shaul A. // Biophys. J. 1993. V. 65. P. 1795–1809.
6. Ren J., Lew S., Wang Z., London E. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 10213–10220.
7. Harroun T.A., Heller W.T., Weiss T.M., Yang L., Huang H.W. // Biophys. J. 1998. V. 76. P. 937–945.
8. Webb R.J., East J.M., Sharma R.P., Lee A.G. // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 673–679.
9. Bretscher M.S. // Nature New Biol. (London). 1971. V. 231. P. 229–232.
10. Adair B.D., Engelman D.M. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 5539–5544.
11. Welsh E.J., Thom D., Morris E.R., Rees D.A. // Biopolymers. 1985. V. 24. P. 2301–2332.

12. Von Freyberg B., Braun W. // *J. Comp. Chem.* 1991. V. 12. P. 1065–1076.
13. Lemmon M., Engelman D.M. // *Quart. Rev. Biophys.* 1994. V. 27. P. 157–218.
14. Pervushin K.V., Arseniev A.S. // *FEBS Lett.* 1992. V. 308. P. 190–196.
15. Samatey F.A., Xu C., Popot J.-L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 4577–4581.
16. Von Heijne G. // *EMBO J.* 1986. V. 5. P. 3021–3027.
17. MacKenzie K.R., Prestegard J.H., Engelman D.M. // *Science.* 1997. V. 276. P. 131–133.

## Modeling of Peptides and Proteins in a Membrane Environment. II. Structural and Energetic Aspects of Glycophorin A in a Lipid Bilayer

P. E. Volynskii, D. E. Nolde, A. S. Arseniev, and R. G. Efremov<sup>#</sup>

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

The conformational space of a hydrophobic peptide fragment of glycophorin A in a lipid membrane was studied with the Monte Carlo method using the solvation model described in the first communication of this series. The simulation was performed for various starting orientations of the peptide relative to the membrane bilayer: outside, inside, partially immersed, and transbilayer. We showed that the membrane substantially stabilizes the  $\alpha$ -helical conformation of the central hydrophobic part of the glycophorin A molecule, which for the most part is immersed in the apolar core of the bilayer. For various conformational states, energy values were calculated and the orientations of the peptide relative to the membrane were characterized. Depending on the thickness of the bilayer, either an entirely  $\alpha$ -helical conformation in transbilayer orientation or a conformation with a kink in the central part of the helix with the *N*- and *C*-termini exposed on one side of the membrane corresponds to the minimal-energy structure. The transmembrane orientation of glycophorin A is energetically advantageous when the membrane thickness is close to the length of its hydrophobic helical portion, which is consistent with the effect of “hydrophobic match” observed experimentally. The prospects for further refinement of the model are discussed.

*Key words: glycophorin A, hydrophobic match effect, molecular modeling, Monte Carlo method, potential energy surface, protein conformational modeling, solvation potential*

<sup>#</sup> 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. 3. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.