



УДК 577.(332 + 34):577.112.02

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАРДИОТОКСИНА А5 С МЕМБРАНОЙ: РОЛЬ КОНФОРМАЦИОННОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ И ГИДРОФОБНЫХ СВОЙСТВ

© 2003 г. А. Г. Коншина[#], П. Е. Волынский, А. С. Арсеньев, Р. Г. Ефремов*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 25.07.2002 г. Принята к печати 05.09.2002 г.

С целью проверки гипотезы о существенной роли локальных конформационных различий кардиотоксинов (цитотоксинов, ЦТ) из яда змей при их взаимодействии с мембраной с помощью молекулярного моделирования исследовано поведение ЦТ А5 из яда кобры *Naja atra* в воде и на границе раздела мембрана–вода. Для ЦТ А5 известны две модели пространственной структуры, полученные методами рентгеноструктурного анализа (РСА) и спектроскопии ЯМР в растворе. Как показал анализ данных молекулярной динамики (МД), петля II токсина в воде принимает определенную Ω -образную форму независимо от стартовой структуры. Изучение взаимодействия экспериментальных (РСА и ЯМР) и полученных в результате МД конформаций ЦТ А5 с липидным бислоем проводили методом Монте-Карло (МК) с использованием разработанной ранее модели неявно заданной мембраны. Установлено, что: 1) в отличие от ранее исследованного ЦТ2 из яда кобры *Naja oxiana* ЦТ А5 связывается с мембраной только петлями I и II и меньшим числом гидрофобных остатков; 2) Ω -образная форма петли II и ее сближенность с петлей I обуславливают формирование на поверхности ЦТ А5 протяженной гидрофобной области, что способствует его встраиванию в липидный бислой; 3) при взаимодействии с мембраной конформация токсина сохраняется; 4) молекула ЦТ А5 имеет близкие значения потенциальной энергии в мембранном и водном окружениях, что позволяет предположить динамический характер связывания. Таким образом, результаты молекулярного моделирования свидетельствуют о том, что при взаимодействии цитотоксина с мембраной наиболее энергетически выгодными оказываются состояния с определенной конфигурацией петель I и II и, как следствие, со специфическим характером распределения полярных-неполярных свойств на поверхности токсина.

Ключевые слова: молекулярное моделирование, молекулярная динамика, метод Монте-Карло, модель сольватации белков, конформационный поиск.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что токсический эффект кардиотоксинов (они же цитотоксины), выделяемых из змеиногояда, обусловлен их взаимодействием с клеточной мембраной. Однако локализация функционально активных участков и механизм связывания этих белков с липидным бислоем изучены мало. Представители семейства цитотоксинов – небольшие высокоосновные β -структурные белки, обладающие широким спектром биологического действия [1]. Они вызывают гиперсокращение мышечных волокон сердечной ткани, индуцируют лизис различных типов клеток (эритроцитов, эпителиальных и пр.) [2], а также, вероятно, способны инги-

бировать ряд мембраносвязанных ферментов (киназа С, Na/K-АТФ-аза и др.) [3], участвовать в формировании ионных каналов в клеточной мембране [4]. *In vitro* они обуславливают слияние и лизис фосфолипидных везикул, дестабилизируют структуру бислоя и индуцируют межмембранное смешивание липидов [5].

Все известные пространственные структуры кардиотоксинов, полученные экспериментальными методами, имеют сходный тип упаковки полипептидной цепи в пространстве – трехпетлевую структуру, стабилизованную четырьмя дисульфидными связями. Однако, несмотря на сходство пространственных моделей и высокий уровень гомологии аминокислотных последовательностей (до 90%), параметры биологической активности цитотоксинов существенно различаются. Характер кардиотоксин-липидного взаимодействия во многом определяется наличием в аминокислотной последовательности второй петли одного из клю-

Сокращения: ЦТ – цитотоксин(ы); МД – молекулярная динамика; МК – Монте-Карло; АПС – атомные параметры сольватации; МГП – молекулярный гидрофобный потенциал; СКО – среднеквадратичное отклонение.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-20-00; эл. почта: nastya@nmr.ru).

чевых консервативных остатков: пролина (ЦТ Р-типа) или серина (ЦТ S-типа). Кардиотоксины Р-типа сильнее взаимодействуют с мембранами, обладают более высокой гемолитической активностью [6]. Токсины обоих типов взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфолипидными бислоями, но с цвиттерийными липидами связываются лишь ЦТ Р-типа [7]. Способность дестабилизировать бислои коррелирует с числом гидрофобных остатков, образующих протяженный неполярный участок молекулярной поверхности. Так, у ЦТ Р-типа петля II более гидрофобна, чем у ЦТ S-типа.

Установлено, что важная роль при взаимодействии цитотоксинов с мембраной принадлежит гидрофобным участкам, расположенным на окончаниях петель. Предполагается, что ЦТ S-типа связываются с мембраной только первой петлей, а ЦТ Р-типа – двумя или даже тремя петлями, что обеспечивает более глубокое проникновение в липидный бислой [6]. О пространственной структуре кардиотоксинов в мембраносвязанном состоянии известно мало. Лишь недавно определена пространственная структура ЦТ2 из яда кобры *Naja oxiana* (ЦТ Р-типа) в мицеллах додецилфосфохолина [8], где мотивом связывания с бислоем являются три гидрофобных петлевых участка молекулы. В водном растворе ЦТ2 принимает две конформации – так называемые основную и минорную формы [9]. Соотношение между населенностями этих состояний составляет 6 : 1. Интересно, что с мембраной взаимодействует лишь основная форма ЦТ2 [8]. Различие между формами обусловлено конфигурацией пептидной связи Val7-Pro8 и, как следствие, пространственной структурой петли I.

Следует отметить, что высокая конформационная подвижность первой и второй петель вообще характерна для представителей семейства цитотоксинов [1, 6] и, вероятно, является их общей функциональной и/или структурной особенностью. Структурно-функциональная гетерогенность молекул ЦТ указывает на то, что, несмотря на значительное сходство укладки полипептидной цепи в пространстве, существенную роль при их взаимодействии с мембраной играют локальные конформационные различия на участках связывания с бислоем. Источником информации о таких различиях могут служить, прежде всего, экспериментальные методы исследования пространственной структуры белков, связанных с мембраной. Однако они довольно трудоемки и в силу ряда технических сложностей (приготовление образцов и пр.) не всегда осуществимы. В связи с этим в настоящее время все более актуальным становится использование методов молекулярного моделирования.

Уже накоплено довольно много информации по взаимодействию с мембраной белков и пептидов,

в которых основным мотивом связывания с бислоем является α -спираль, преимущественно гидрофобная (в случае ее трансмембранной ориентации) или амфифильная – у белков, периферически взаимодействующих с мембраной [10, 11]. Основываясь на структурных данных с атомным уровнем разрешения, взаимодействие между α -спиралями и интерфейсом мембраны широко исследуют с помощью методов компьютерного моделирования [12]. Так, хорошее согласие результатов компьютерного моделирования с экспериментальными данными было получено для молекул, обладающих антибактериальной, фузионной или каналобразующей активностью, среди которых присутствуют как интегральные мембранные белки (грамицидин А [13], порины [14], бактериородопсин [15] и др.), так и периферические (фосфолипаза А2 [16], фузионные пептиды из гемагглютинаина вируса гриппа [17] и др.).

В зависимости от способов учета эффекта растворителя (липидного бислоя) существует ряд подходов к моделированию мембранных белков, основанных на использовании эмпирических силовых полей. Наиболее перспективными среди них считаются модели с явно [18] и неявно заданным растворителем [19, 20]. Так, нами была разработана модель неявно заданной мембраны, где влияние растворителя учитывали путем добавления в функцию потенциальной энергии белка в “вакууме” специального термина, основанного на использовании эмпирических атомных параметров сольватации (АПС) [21]. Данный подход хорошо себя зарекомендовал в расчетах α -спиральных пептидов, взаимодействующих с мембраной [17, 19, 21].

В то же время данных по моделированию мембраносвязанных β -структурных белков практически нет, что обусловлено прежде всего отсутствием структурной информации. Появление экспериментальных данных по пространственной структуре ЦТ2 в мицеллах (см. выше [8]) позволило охарактеризовать новый мотив связывания белков с бислоем – гидрофобные окончания β -структурных петель. При этом расчет, выполненный с использованием модели неявно заданной мембраны, дал реалистичное описание взаимодействия ЦТ2 с бислоем, хорошо согласующееся с экспериментальными данными [22]. Очевидно, что исследование новых представителей семейства цитотоксинов, а также других β -структурных мембраноактивных белков будет способствовать пониманию процессов, происходящих при их встраивании в мембрану.

В данной работе проведено теоретическое исследование взаимодействия с мембраной кардиотоксина А5. Этот β -структурный белок, выделенный из яда тайваньской кобры *Naja atra*, относится к ЦТ Р-типа. Выбор токсина А5 обусловлен

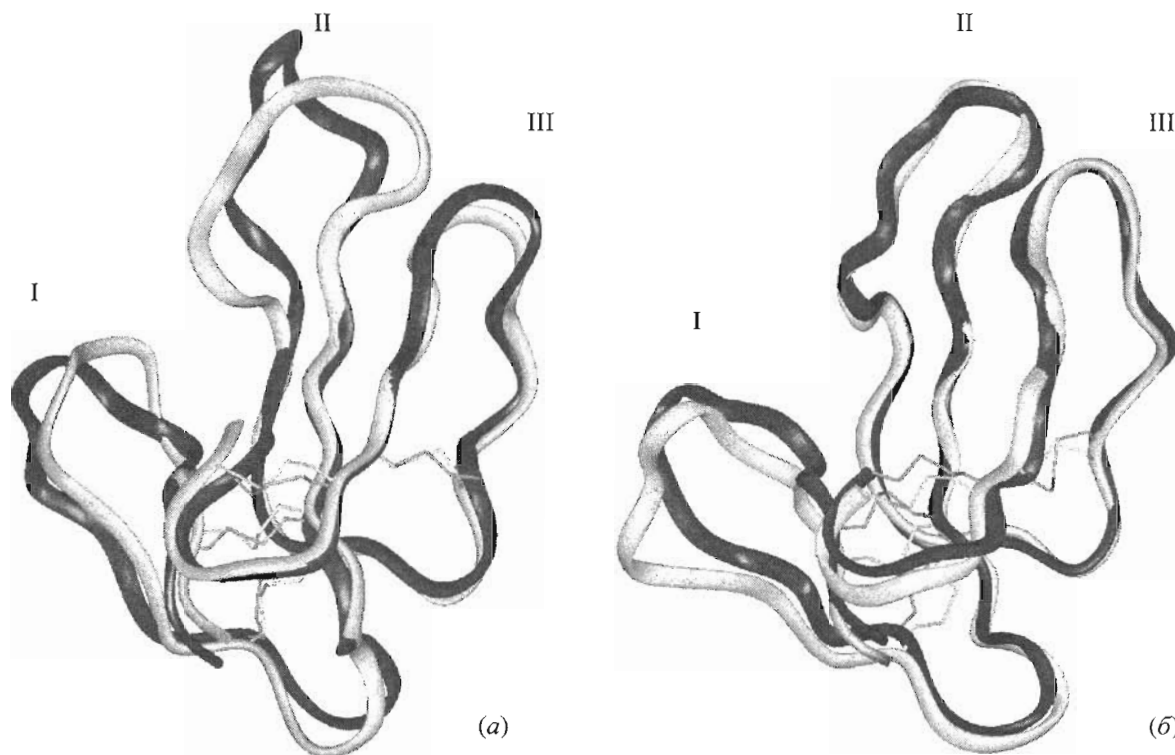


Рис. 1. Пространственные структуры ЦТ А5, полученные с помощью PCA и спектроскопии ЯМР (а), и равновесные МД-структуры (б). Конформации совмещены по атомам основной цепи остатков, входящих в состав элементов вторичной структуры. Черным цветом показаны модели ЯМР₀ и ЯМР_{мд}, серым – PCA₀ и PCA_{мд}. Римскими цифрами (I, II, III) обозначены петлевые участки молекул. Дисульфидные связи для каждой модели показаны стержнями.

наличием для него двух моделей пространственной структуры, полученных с помощью рентгеноструктурного анализа [23] и метода спектроскопии ЯМР [24]. Между моделями имеются существенные различия, особенно для первой и второй петель, где среднеквадратичное отклонение (СКО) по атомам основной цепи составляет 3–4 Å.

Цели настоящей работы: 1) исследование конформационной подвижности ЦТ А5 в воде с помощью метода молекулярной динамики (МД); 2) изучение влияния локальных конформационных различий на характер взаимодействия ЦТ А5 с мембраной. При этом анализ конформационного пространства молекулы с учетом эффекта среды (модель неявно заданной мембраны) проводили с помощью метода Монте-Карло (МК). Ввиду ряда структурно-функциональных особенностей семейства цитотоксинов – сходство структур при существенно разной биологической активности, наличие для одного белка нескольких конформационных состояний, по-разному взаимодействующих с мембраной, представляется особенно интересным, и решение этой задачи может явиться ключом к пониманию зависимости: конформация–характер связывания с мембраной–функциональная активность.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Далее используются следующие обозначения: PCA₀ и ЯМР₀ – трехмерные модели, полученные с помощью рентгеноструктурного анализа и спектроскопии ЯМР; PCA_{мд} и ЯМР_{мд} – конформеры, выбранные из равновесных МД-структур, полученных при стартах с моделей PCA₀ и ЯМР₀ соответственно.

Молекулярная динамика ЦТ А5

Для исследования конформационных возможностей ЦТ А5 были получены траектории МД в воде, стартуя от экспериментальных моделей пространственной структуры токсина: ЯМР₀ и PCA₀. Как видно из рис. 1, модели PCA₀ и ЯМР₀ имеют разное пространственное строение первой и второй петель. Так, значение СКО по атомам основной цепи петли I (остатки 3–13) составляет 3.4 Å; петли II (остатки 27–36) – 3.5 Å; петли III (остатки 43–50) – 1.5 Å. Анализ данных МД показал, что равновесные структуры ЯМР_{мд} и PCA_{мд}, полученные из каждой траектории, более сходны между собой и с моделью PCA₀, чем с ЯМР₀. Так, значение СКО по атомам основной цепи стартовых моделей PCA₀–ЯМР₀ составляет 2 Å. А попарное сравнение каждого конформера из одной

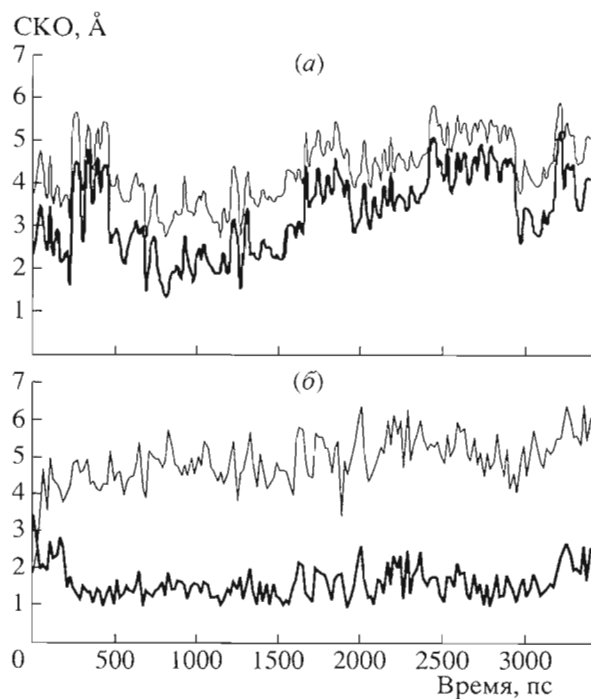


Рис. 2. Молекулярная динамика ЦТ А5 в воде. Графики зависимости от времени среднеквадратичного отклонения (СКО) МД-конформеров, полученных при старте от модели ЯМР₀, по сравнению со стартовыми моделями: ЯМР₀ (кривая показана тонкой линией) и РСА₀ (жирная линия). На графиках: СКО по атомам (а) основной цепи первой петли: остатки 3–13; (б) второй петли: остатки 27–36.

МД-траектории с каждым из другой свидетельствует о том, что значения СКО существенно уменьшаются и достигают 1.2–1.4 Å.

В ходе МД модели ЯМР₀ (после ~200 пс) наблюдается изменение конформации второй петли, которая, уширяясь, приобретает форму, характерную для РСА₀-модели (рис. 1). Это проявляется в увеличении СКО для второй петли МД-конформеров ЯМР₀ по сравнению со своей стартовой структурой и уменьшении значений СКО до 1.5 Å в сравнении с моделью РСА₀ во времени (рис. 2). При этом увеличивается площадь контакта I и II петель, и ее значение приближается к площади, характерной для модели РСА₀ (~270 Å²). Площадь контакта этих петель в РСА₀- и ЯМР₀-моделях составляет 340 и 180 Å² соответственно. Сходство пространственных конфигураций петли II в моделях РСА_{мд}, ЯМР_{мд} и РСА₀ указывает на то, что такая Ω-образная форма более стабильна и энергетически выгодна. Вряд ли тут можно говорить о наличии в растворе двух конформационных состояний (как, например, в случае первой петли ЦТ2 [9]), поскольку в ходе МД ЯМР₀-модели вторая петля достаточно быстро (через 200 пс от начала уравнивания) изменяет свою стартовую конформацию на Ω-образную, а в МД

РСА₀ существенных изменений в ее пространственном строении не происходит. Такое поведение петли II в ходе МД ЯМР₀-модели, вероятно, обусловлено наличием неблагоприятных ван-дер-ваальсовых взаимодействий в стартовой структуре. Следует отметить, что первая петля конформационно лабильна в обоих случаях (средние значения СКО по атомам основной цепи ~3.5 Å) и имеет разное пространственное строение как в стартовых, так и в равновесных МД-структурах (рис. 1, 2). Таким образом, результаты МД позволяют предположить, что конформация петли II, наблюдаемая в модели ЯМР₀, – следствие недостаточно корректного расчета пространственной структуры ЦТ А5 по данным ЯМР-спектроскопии.

В ходе анализа результатов МД были выявлены следующие особенности конформационного поведения моделей ЯМР₀ и РСА₀ в растворе: тенденция к принятию петель II Ω-образной формы, конформационная подвижность петли I. Чтобы понять, взаимодействует ли вообще ЦТ А5 с мембраной, и влияют ли найденные конформационные различия (особенно в петле II) на параметры связывания ЦТ А5 с липидным бислоем, мы исследовали методом МК конформационное пространство как стартовых, так и равновесных моделей ЦТ А5 с учетом эффекта растворителя – в мембранном и в водном окружениях.

Исследование конформационного пространства ЦТ А5 методом МК

МК-моделирование взаимодействия β-структурных белков с неявно заданным липидным окружением ранее было выполнено для других представителей семейства кардиотоксинов – ЦТ2 и ЦТ1, выделенных из ядов кобр *N. oxiana* и *N. atra* соответственно [22]. В случае ЦТ2 с мембраной взаимодействует большее число гидрофобных остатков из трех петель. Результаты моделирования хорошо согласуются с экспериментальными данными ЯМР для ЦТ2 в мицеллах додецилфосфохолина [8]. Таким образом, разработанный теоретический подход корректно воспроизводит основные закономерности поведения ЦТ2 на границе раздела мембрана–вода и, следовательно, может быть применен и для других белков этого семейства.

Исследование методом МК конформационного пространства моделей ЯМР₀, РСА₀, ЯМР_{мд} и РСА_{мд} в присутствии неявно заданной мембраны показало, что для всех структур в наиболее энергетически выгодных состояниях белок взаимодействует с неполярной средой посредством гидрофобных остатков первой и второй петель: 7(8)–11 и 30–34. При этом состояниям с минимальной энергией (E_{\min}) как в мембраносвязанном состоянии, так и в воде соответствует структура, полученная в ходе МК-поиска для РСА₀-модели (рис. 3).

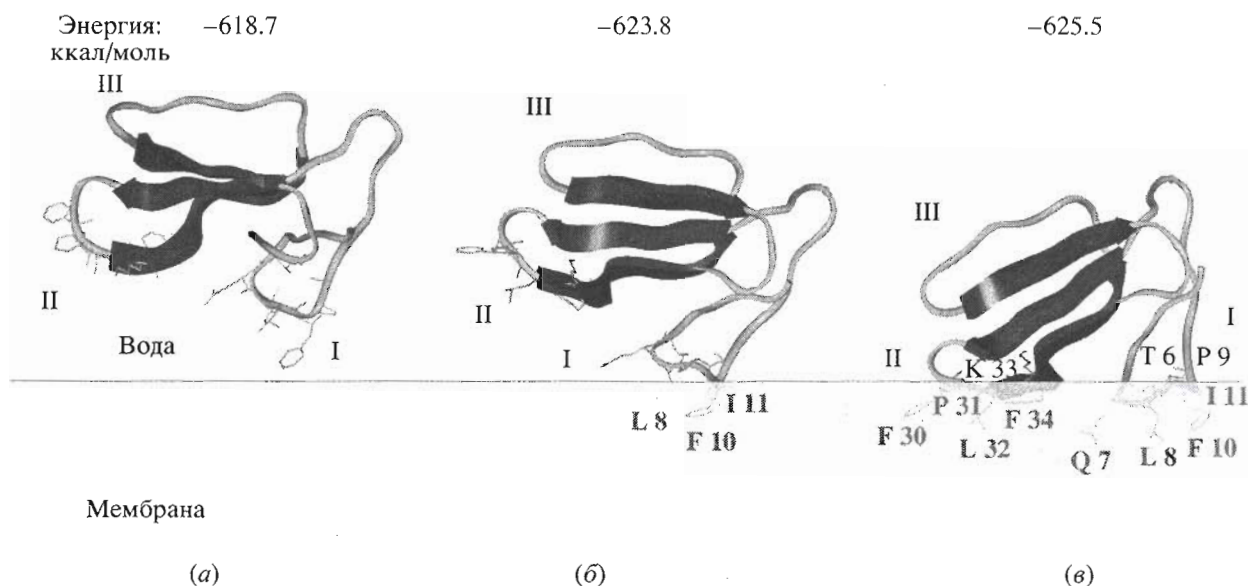


Рис. 3. Результаты моделирования методом Монте-Карло ЦТ A5 в среде, имитирующей мембрану. Стартовая структура – $PCSA_0$. Показаны примеры низкоэнергетических (в пределах $[E_{min}, E_{min} + 10$ ккал/моль]) состояний $PCSA_0$, находящихся полностью в воде (а); взаимодействующих с мембраной первой петлей (б); остатками первой и второй петлей (в). Пространственные структуры молекул даны в виде ленточных диаграмм. β -Тяжи представлены стрелками черного цвета. Остатки первой и второй петель ЦТ A5, контактирующие с мембраной, обозначены однобуквенным кодом с номером, и показаны конформации их боковых цепей. Неполлярная область мембраны выделена серым цветом.

В дальнейшем наиболее энергетически выгодные состояния каждой из анализируемых структур (YMP_0 , $PCSA_0$, $YMP_{мд}$, $PCSA_{мд}$), найденные в воде и в мембране, обозначены индексами – “в” и “м” соответственно. Здесь и далее термин “энергия” относится к сумме внутренней энергии белка и энергии его взаимодействия (E_{solv}) с гетерогенной модельной мембраной, а энергия последней не рассматривается.

Значение энергии состояния $PCSA_0^м$ лишь на 2 ккал/моль ниже, чем $PCSA_0^в$ (таблица). Среди энергетически выгодных состояний модели $PCSA_0$ (в пределах $[E_{min}, E_{min} + 10$ ккал/моль]) преобладают конформации, встроенные в мембрану, причем максимум их распределения по энергии значительно сдвинут в сторону E_{min} (данные не при-

Средние значения вкладов различных видов взаимодействий* в полную энергию молекул. Данные приведены для набора наиболее энергетически выгодных структур ($E_{min}, E_{min} + 10$ ккал/моль), полученных методом Монте-Карло

Стартовая структура	E_{min}^*	E_{solv}^*	E_{vdw}^*	E_{hb}^*	E_{el}^*	E_{tors}^*
мембрана						
$PCSA_0$	-625.2	-199.1	-470.1	-58.7	60.3	38.3
YMP_0	-550.6	-213.8	-406.4	-47.1	66.4	48.7
$YMP_{мд}$	-612.3	-191.9	-464.2	-58.1	57.0	45.1
$PCSA_{мд}$	-599.1	-190.8	-462.1	-62.2	50.9	61.3
вода						
$PCSA_0$	-623.4	-200.5	-463.3	-57.8	57.5	38.7
YMP_0	-535.7	-201.7	-407.2	-47.4	67.5	48.2
$YMP_{мд}$	-589.3	-181.9	-451.8	-60.9	55.6	49.2
$PCSA_{мд}$	-591.2	-190.7	-460.6	-55.6	56.6	58.2

* E_{min} – минимальная полная энергия молекулы; E_{solv} – энергия взаимодействия со средой; E_{vdw} – энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий; E_{hb} – энергия водородных связей; E_{el} – энергия электростатических взаимодействий; E_{tors} – энергия торсионных взаимодействий.

ведены). Лишь около 5% структур полностью находятся в воде, несмотря на присутствие мембраны. Последние обладают и самыми высокими значениями энергии в указанном диапазоне. Около 20% структур из рассматриваемой выборки встраиваются в бислой только первой петлей. Наоборот, в водном окружении максимальное представительство структур наблюдается вблизи верхнего предела диапазона (E_{\min} , $E_{\min} + 10$ ккал/моль). Таким образом, реальный энергетический разрыв между мембраносвязанными и находящимися в воде состояниями составляет ~ 6 ккал/моль и обусловлен снижением вкладов E_{solv} неполярных остатков при их взаимодействии с мембраной. Кроме того, пространственные структуры PСА_0^{M} и PСА_0^{B} практически совпадают ($\text{СКО} \leq 0.9 \text{ \AA}$, при этом СКО моделей ЯМР_0^{M} и ЯМР_0^{B} – 2.3 \AA , а для МД-структур около 1.5 \AA). Согласно данным спектроскопии ЯМР [8] и теоретического анализа [22], консервативность пространственной структуры в средах с различной полярностью (вода и бислой) характерна и для ЦТ2. Вместе с тем, различие в энергии мембраносвязанного и находящегося в воде состояний ЦТ2, значительно больше (>15 ккал/моль) [22, 25]. Предполагается, что этот запас энергии определяет функциональную активность ЦТ2, его способность дестабилизировать бислой. Таким образом, анализ данных МК позволяет предположить, что связывание ЦТ А5 с мембраной имеет динамический характер, равновесие которого сдвинуто в сторону мембраносвязанной формы.

С другой стороны, значения полной энергии как состояния ЯМР_0^{M} , так и ЯМР_0^{B} существенно выше (таблица). Основной положительный вклад (~ 60 ккал/моль) в этот эффект дает энергия вандер-ваальсовых взаимодействий. Различие в энергии между мембраносвязанными и находящимися в водном окружении состояниями составляет ~ 15 ккал/моль. Анализ МК-данных для $\text{ЯМР}_{\text{мд}}$ - и $\text{PСА}_{\text{мд}}$ -конформеров показал, что эти состояния обладают промежуточными значениями средней полной энергии и могут взаимодействовать с бислоем обеими петлями. Несмотря на различие стартовых МД-структур (значение СКО петли I достигает 4 \AA), полученных из разных МД-траекторий, в низкоэнергетических состояниях, найденных в ходе МК поиска, молекула ЦТ А5 встраивается в мембрану одними и теми же остатками и имеет сходные значения энергетических термов, что позволяет надеяться на корректность полученных результатов.

Распределение молекулярного гидрофобного потенциала (МГП) на поверхности ЦТ А5 и геометрия связывания с мембраной

В качестве доминирующего фактора при взаимодействии белков с мембраной обычно рассматривают гидрофобные контакты. Действительно, неполярные остатки, встроенные в бислой, во всех структурах имели более низкую энергию взаимодействия со средой, чем в водном окружении. Однако на вопрос – определяется ли степень взаимодействия токсин–мембрана исключительно наличием тех или иных гидрофобных остатков или зависит от особенностей конформации петлевых участков, взаимодействующих с мембраной, – ответ был не столь очевиден, как в случае с ЦТ2. Напомним, что для ЦТ2 существенные различия в связывании с мембраной основного и минорного состояний определялись уже на уровне числа гидрофобных остатков, встраивающихся в мембрану, и тем самым значительно понижающих энергию сольватации [22]. Так, по расчетным данным, различие в энергии сольватации низкоэнергетических мембраносвязанных конформеров этих двух состояний составляло ~ 30 ккал/моль, а в эксперименте связывание с мембраной наблюдали лишь для основного состояния ЦТ2 [8]. В случае ЦТ А5, несмотря на существенные различия в полной энергии (в основном за счет более высоких значений E_{vdw} в структуре ЯМР_0^{M} (таблица)), встраивание в мембрану у большинства энергетически выгодных состояний происходит с помощью гидрофобных остатков 7–11 (первая петля) и 30–34 (вторая петля). Исключение составляет модель ЯМР_0^{M} , у которой полярный остаток Gln7 полностью находится в воде и дает основной отрицательный вклад в энергию сольватации остатков первой петли, которая в свою очередь обуславливает понижение энергии сольватации всей молекулы ЯМР_0^{M} в сравнении с PСА_0^{M} . Вместе с тем, энергии взаимодействия аминокислотных остатков первой и второй петель с неполярным окружением для низкоэнергетических состояний обеих структур сопоставимы (рис. 4). Так, для PСА_0^{M} и ЯМР_0^{M} энергии взаимодействия петель I и II с гидрофобным слоем (E_{mem}) равны -7.9 ; -3.0 ккал/моль и -5.0 ; -2.0 ккал/моль соответственно, а с интерфейсом (E_{int}) -1.9 ; -5.5 ккал/моль и -3.2 ; -3.8 ккал/моль.

Чтобы понять, имеются ли отличия в гидрофобных свойствах мембраносвязанных состояний, обусловленные различиями в пространственной структуре, мы проанализировали характер распределения МГП на поверхности белка. В методе МГП каждому атому белка соответствует константа гидрофобности, рассчитываемая из экспериментальных данных по свободным энерги-

ям переноса большого числа органических молекул в системе октанол–вода (см. ссылки в работе [26]). Используя указанный подход, можно количественно оценить степень гидрофобности/гидрофильности в заданной области пространства, например, на поверхности белка. Зоны с высокими и низкими значениями МГП свидетельствуют о гидрофобном и гидрофильном характере поверхности соответственно. Наглядно представить указанные свойства можно с помощью двумерных МГП-карт (см. “Эксперимент. часть”). На полученных картах (рис. 5а–5г) видно, что гидрофобный участок поверхности второй петли (остатки 30–34) модели ЯМР₀^М имеет значительно меньшую площадь, а участок поверхности, соответствующий остаткам 7–11 первой петли, более гидрофилен, чем в остальных структурах. В то же время паттерны гидрофобности в структурах ЯМР_{мд}^М и РСА_{мд}^М весьма сходны с таковыми в РСА₀^М.

Поскольку значение МГП в данной точке пространства определяется расположением близлежащих атомов белка, вследствие конформационных отличий между моделями ЯМР₀^М и РСА₀^М существенно разной оказывается и геометрия распределения остатков в области контакта с мембраной и соседних с ними. Структуры отличаются по степени экспонированности в растворитель гидрофобных и полярных поверхностей отдельных остатков, находящихся в контакте с бислоем. В петле I модели ЯМР₀^М на ~20% выше экспонированность полярных атомов (в основном в области интерфейса вода–мембрана), образующих гидрофильный участок, что наглядно отражается в появлении на карте области с низкими значениями МГП (рис. 5а). Во всех энергетически выгодных мембраносвязанных состояниях, за исключением модели ЯМР₀^М, конформация второй петли сходна с таковой для РСА₀, т.е. имеет характерную Ω-образную форму и большую степень контакта с первой петлей, а область с высокими значениями МГП в районе остатков 30–34 – большую площадь по сравнению с соответствующей областью в ЯМР₀^М. Кроме этого, гидрофобные зоны, соответствующие областям контакта петель I и II с мембраной, оказываются значительно более сближены, чем для ЯМР₀^М-модели. Таким образом, факт стабильного воспроизведения разными методами Ω-образной конформации второй петли, соответствующей РСА₀, вряд ли случаен. В ходе динамики данная конформация наблюдается во всех равновесных МД-структурах, полученных при старте как с ЯМР₀, так и с РСА₀.

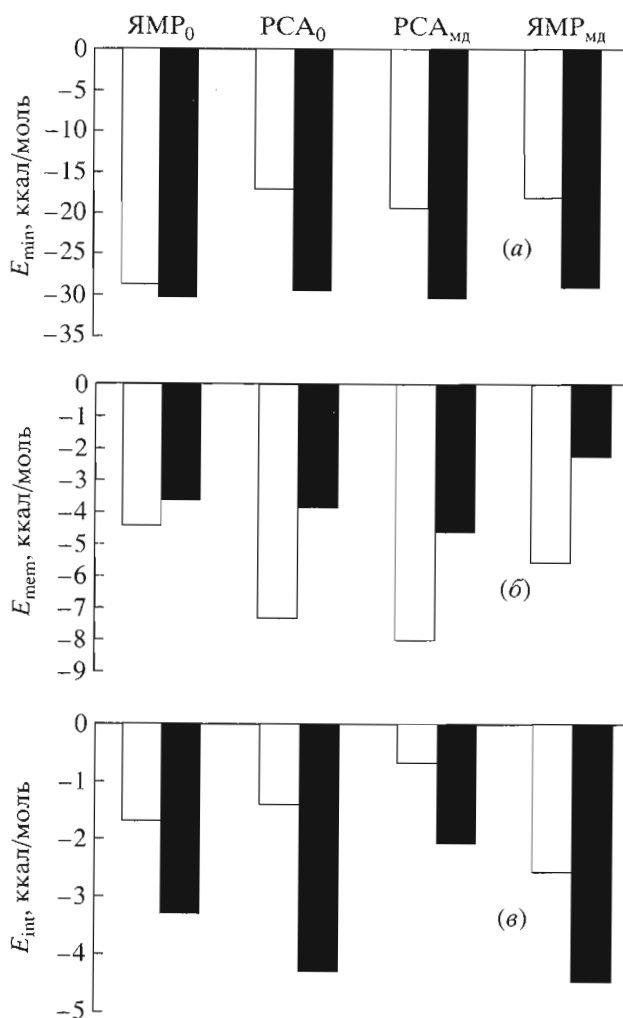


Рис. 4. Энергии взаимодействия остатков петли I (остатки 3–13, белый цвет) и петли II (остатки 27–36, черный цвет) с водой (E_{\min}) (а); гидрофобным слоем мембраны (E_{mem}) (б) и интерфейсом вода–мембрана (E_{int}) (в). Значения приведены для конформеров с минимальной энергией, полученных методом Монте-Карло при старте с моделей РСА₀, ЯМР₀, РСА_{мд}, ЯМР_{мд} в присутствии мембраны.

Результаты двух независимых подходов – МД и МК – показывают, что Ω-образная конформация второй петли, вероятно, является более адаптированной и энергетически выгодной при взаимодействии ЦТ А5 с мембраной. Подобная конформация петли II наблюдается и в ЦТ2, а также в ряде других экспериментально установленных пространственных структур кардиотоксинов. Такая форма петли, благодаря которой гидрофобные окончания петель расположены примерно на одном уровне относительно друг друга, и площадь контакта первой и второй петель становится больше, обуславливает создание на поверхности белка достаточно протяженной и непрерывной области с высоким гидрофобным потенциалом.

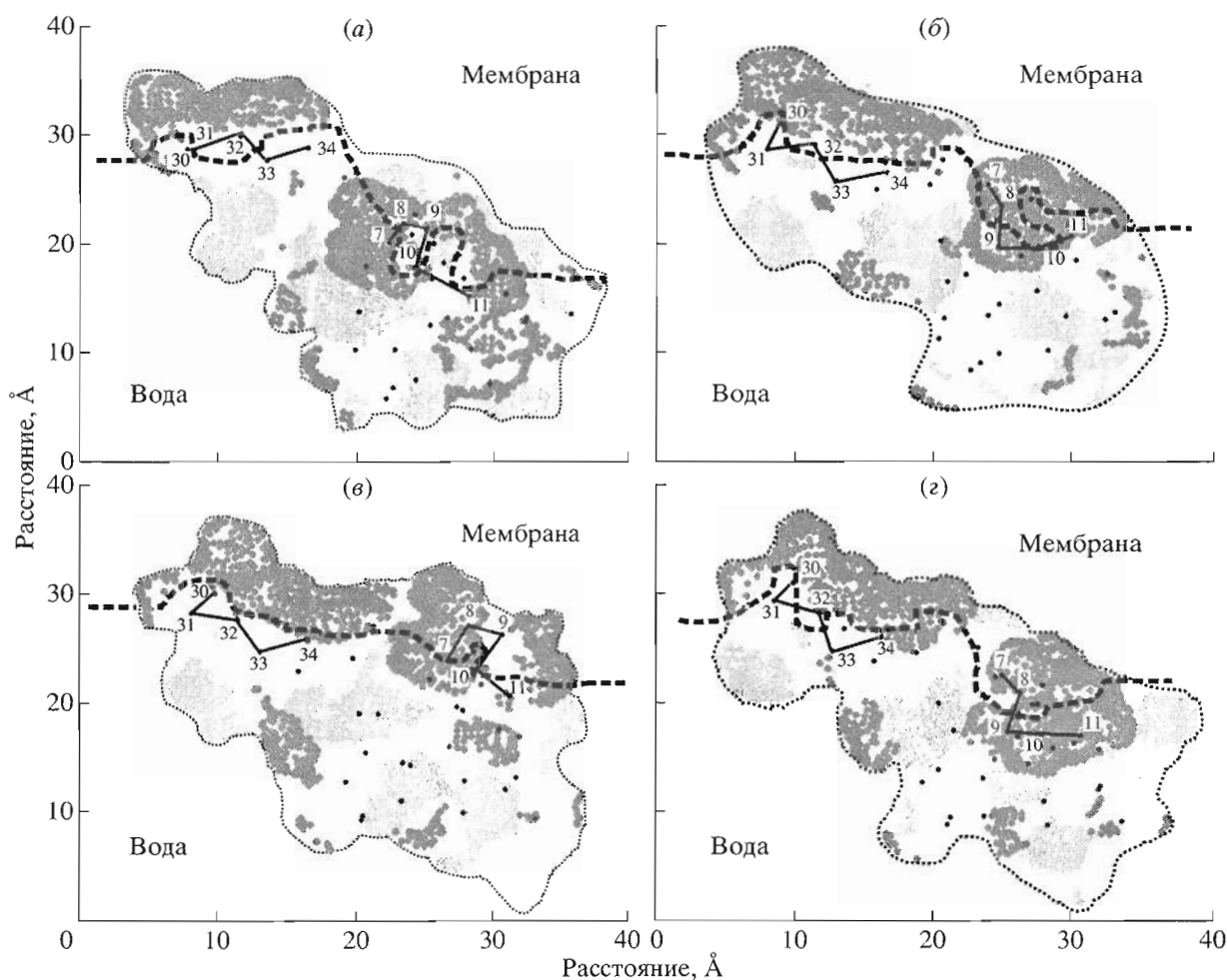


Рис. 5. Двумерные карты распределения молекулярного гидрофобного потенциала (МГП) на поверхности для наиболее низкоэнергетических структур ЦТ А5, полученных методом Монте-Карло в присутствии мембраны при следующих стартах: ЯМР₀^М (а), РСА₀^М (б), ЯМР_{мд}^М (в) и РСА_{мд}^М (г). Проекция на плоскость А (см. рис. 7). Контур молекулярной поверхности ЦТ А5 показан тонкой прерывистой линией. Гидрофобные (МГП > 0.1) и гидрофильные (МГП < -0.1) области обозначены темно- и светло-серым цветом соответственно. Значения МГП приведены в условных единицах. Черными точками указаны проекции координат С^α атомов остатков, цифрами – С^α атомы соответствующих остатков, взаимодействующих с мембраной. Пунктирной линией изображена граница раздела мембрана-вода.

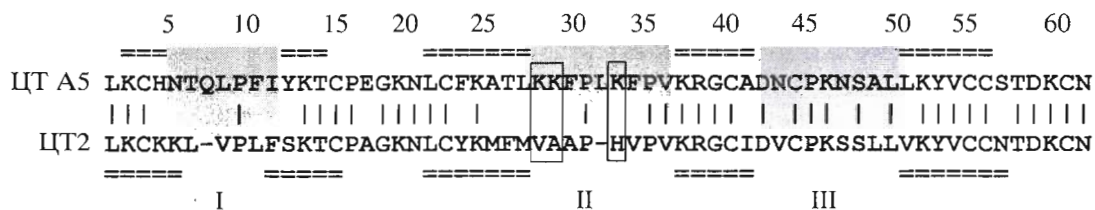


Рис. 6. Выравнивание аминокислотных последовательностей ЦТ2 (*Naja oxiana*) и ЦТ А5 (*Naja atra*). Идентичные остатки отмечены символами "=", β-тяжи – символами "=". Участки петель выделены серым цветом. Римскими цифрами (I, II, III) обозначены петлевые участки молекул. Остатки лизина, находящиеся на концевом участке петли II молекулы ЦТ А5, и соответствующие им остатки в последовательности ЦТ2 заключены в прямоугольники.

По-видимому, это и определяет взаимодействие цитотоксинов с мембраной. Очевидно также, что степень взаимодействия определяется гидрофобностью аминокислотных остатков, расположен-

ных в зоне окончаний петель. Как видно из выравнивания последовательностей ЦТ2 и ЦТ А5 (рис. 6), значительные отличия в аминокислотной последовательности наблюдаются в петлях II и I. По

сравнению с ЦТ2 окончание петли II в ЦТ A5 более полярно из-за замен Val28Lys, Ala29Lys и His33Lys. Именно с этой петлей часто связывают отличия в функциональной активности разных представителей семейства цитотоксинов [1]. Мы полагаем, что наличие трех заряженных остатков предотвращает дальнейшее встраивание токсина в гидрофобный слой, что приводит к более слабому связыванию петли II и отсутствию встраивания в бислой петли III.

Таким образом, моделирование, проведенное для ЦТ A5, позволило получить ряд интересных результатов. Во-первых, выявлен несколько отличный от ЦТ2 мотив связывания с мембраной – гидрофобные (за исключением Gln7 и Lys33) окончания первой и второй петель. Во-вторых, сохранение пространственной структуры токсина в мембранном и водном окружениях с незначительными различиями в полной энергии этих состояний указывает на динамический характер связывания ЦТ A5 с мембраной. В-третьих, локальные конформационные различия в петлевых участках молекулы могут не только приводить к значительному снижению эффективности связывания с мембраной (как в случае ЦТ2), но и обуславливать существенные изменения гидрофобных характеристик структуры, при том, что число остатков, взаимодействующих с мембраной, практически не меняется. Другими словами, примененный нами алгоритм позволил детально охарактеризовать параметры связывания с мембраной, выявить особенности пространственного строения петли II, создающие более или менее благоприятные условия для встраивания соответствующих остатков в бислой. Кроме того, МД, проведенная в воде для двух экспериментально полученных моделей ЦТ A5, показала, что, независимо от стартовых структур, петля II принимает в воде Ω -образную форму. Таким образом, основываясь на результатах двух независимых подходов, МД и МК, мы предполагаем, что из двух известных моделей пространственной структуры ЦТ A5 (ЯМР₀ и РСА₀) более корректной является кристаллографическая структура.

Полученные результаты позволяют надеяться, что разработанный подход может быть эффективно применен для исследования взаимодействия других β -структурных белков с мембраной. В дальнейшем предполагается изучение ряда гомологичных кардиотоксинов, что может существенно прояснить, какие именно особенности пространственного строения, взаимного расположения петель могут быть ответственны за связывание с мембраной, определяют его геометрические и энергетические параметры и, в конечном счете, обуславливают функциональную активность.

Следует отметить, что используемая теоретическая модель неявно заданного бислоя является до-

статочно приближенной и не учитывает ряд важных характеристик биологических мембран, таких, как неоднородность диэлектрических свойств, химический состав, микроскопическая природа взаимодействия белок–липиды и т.д. А значит, в рамках данной модели нельзя моделировать сам механизм встраивания белков в мембрану. Речь не идет также и о получении с помощью расчетов пространственных структур с высоким разрешением, как это возможно, например, в эксперименте. Тем не менее эффективность даже такой упрощенной модели достаточно высока, чтобы оценить характер связывания с мембраной белков различных классов. Более того, сочетание нескольких методов (например, МД и МК) позволит повысить эффективность и надежность предсказаний и расширить круг задач, решаемых в ходе компьютерного эксперимента. Оценив с помощью метода МК характер связывания белка с мембраной, можно в дальнейшем использовать полученные результаты для выбора рациональной стартовой модели при расчете методом МД процесса взаимодействия белка с явно заданной гидратированной мембраной. Тем самым значительно упрощается процедура поиска такой структуры в ходе самой динамики. Это позволит существенно увеличить длину рассчитываемой МД-траектории сложных мембранных систем.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Молекулярная динамика кардиотоксина A5

Координаты атомов экспериментальных моделей ЦТ A5 были взяты из Брукхэйвенского банка данных белковых структур (Protein Data Bank). Коды структур, полученных методами спектроскопии ЯМР в растворе [24] и рентгеноструктурного анализа [23]: 1CVO и 1KXI соответственно. Для каждой из них рассчитывали МД в воде с силовым полем GROMACS [27]. В результате получены две траектории МД по ~ 3.4 нс каждая.

Белок помещали в прямоугольную ячейку с ~ 4500 молекулами воды с наложенными периодическими граничными условиями. Минимальное расстояние от стенки ячейки до ближайшего к ней атома структуры составляло 7 Å. При расчете электростатических взаимодействий применяли модифицированный метод сумм Эвальда (PME) [28] с отсечкой 9 Å. Ван-дер-ваальсовы взаимодействия вычисляли с использованием функции “сдвига” с параметрами 7/9 Å. Для каждой из структур применяли одинаковый протокол расчета МД.

Для уравнивания системы белок–вода проводили поэтапную минимизацию ее энергии, фиксируя сначала координаты всех атомов белка, затем атомов основной цепи и, наконец, только C^α

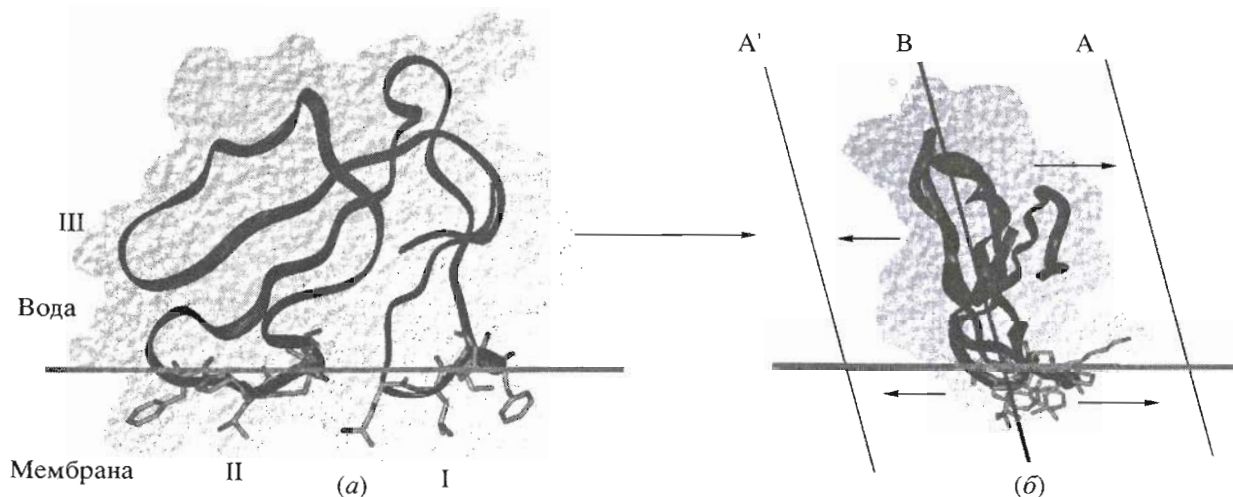


Рис. 7. Картирование гидрофобных/гидрофильных свойств поверхности ЦТ А5. (а) Наиболее энергетически выгодное состояние молекулы А5, полученное в результате расчета методом Монте-Карло. (б) Расчет молекулярного гидрофобного потенциала (МГП) для молекулы А5 (вид сбоку). Плоскость В условно делит множество точек молекулярной поверхности (выделена серым цветом) на два подмножества. Для каждого из подмножеств значения МГП и координаты C^{α} атомов проецируются на плоскости А и А' соответственно. Граница раздела мембрана–вода обозначена горизонтальной чертой. Структура токсина представлена в виде ленточной диаграммы, ее петли обозначены цифрами I–III. Аминокислотные остатки, взаимодействующие с мембраной, показаны в виде стержневых моделей.

атомов. Далее минимизировали энергию всей системы без ограничений. На каждом этапе выполняли 300 шагов минимизации методом наискорейшего спуска. Для лучшего уравнивания молекул воды после минимизации энергии рассчитывали короткую (5 пс) траекторию МД воды при $T = 300$ К и фиксированными координатами атомов белка. Затем проводили нагревание системы белок–вода в течение 20 пс от 5 до 300 К. Полученную конфигурацию системы использовали в качестве стартовой для дальнейших расчетов МД при 300 К в течение 3.4 нс. Расчет МД проводили в ансамбле NVT с шагом 1 фс.

Для анализа МД-траекторий использовали набор структур, полученных путем выборки конформеров (с шагом 2 пс), накопленных в процессе 3.4-наносекундных МД (включая этап уравнивания).

Расчет МД и анализ данных проводили с помощью программного пакета GROMACS [27], а также программ DSSP [29] и NACCESS [30] (расчет вторичной структуры и площади поверхности, доступной растворителю). В качестве равновесных МД-структур, используемых в дальнейших вычислениях, выбирали по одному конформеру для каждой из моделей ЦТ А5, полученному на конечном участке МД-траектории (длиной 1 нс), где молекула характеризуется стабильным поведением во времени. Так, среднее значение СКО на участке от 2 до 3 нс по атомам основной цепи МД-конформеров от структуры, полученной усреднением всех МД-структур на данном участке, составляет около 1 Å. Это сравнимо с различия-

ми, наблюдаемыми среди набора структур, полученных методом спектроскопии ЯМР. Соответствующее значение СКО для петли I составляет 1.2 Å, а максимальные значения – до 2.5 Å. Показатели подвижности (СКО) сходны для обеих МД-траекторий, полученных для стартовых моделей: ЯМР₀ и РСА₀.

Конформационный поиск методом Монте-Карло

Для оценки характера взаимодействия ЦТ А5 с мембраной и того, насколько найденные в ходе МД конформационные различия влияют на параметры связывания, с помощью метода МК исследовали конформационное пространство следующих структур: РСА₀, ЯМР₀, РСА_{мд}, ЯМР_{мд} в мембранном и водном окружении. В расчетах использовали модель трехслойной (вода–циклогексан–вода) неявно заданной мембраны [21]. Вычисления проводили с помощью программы FANMEM – модифицированной версии пакета FANTOM [26]. Для каждой из структур применяли одинаковый алгоритм расчета. Гидрофобный слой мембраны (толщиной 30 Å) задавали уравнением: $|z| \leq 15$ Å, где ось z – нормаль к плоскости мембраны. Стартовые конформации помещали в воде, вне гидрофобной области мембраны. Для изменения ориентации молекулы ЦТ А5 относительно мембраны во время моделирования методом МК к N-концу был добавлен фрагмент из 20 фиктивных остатков. Атомы данных остатков имели нулевые параметры силового поля и, следовательно, не давали

вклад в энергию системы. Атом азота в первом из фиктивных остатков всегда располагали в начале системы координат (0, 0, 0), т.е. в центре мембраны. Отбор конформеров на каждом шаге проводили по критерию Метрополиса [31]. Для расчета невалентных взаимодействий использовали сферическую отсечку 20 Å. Выбор варьируемых двугранных углов, исключая углы ω , осуществляли случайным образом. При каждом запуске МК брали наиболее низкоэнергетический конформер, полученный на предыдущей стадии. Для эффективного преодоления локальных минимумов использовали схему подстройки температуры [26].

Первые 10^4 шагов МК рассчитывали с ограничениями, накладываемыми на расстояния между атомами основной цепи остатков, входящих в состав элементов вторичной структуры (β -тяжей), варьируя 1–3 двугранных угла у фиктивных остатков. Далее выполняли несколько последовательных расчетов МК ($3\text{--}5 \times 10^3$ шагов каждый) без ограничений, варьируя 1–2 случайно выбранных двугранных угла. В общей сложности, для каждой из исследуемых структур было сделано $\sim 3.5 \times 10^4$ шагов МК.

Анализ результатов МК-поиска

Для энергетически выгодных конформационных состояний (в пределах 10 ккал/моль от состояния с минимальной полной энергией) рассчитывали индивидуальные вклады в энергию взаимодействия с растворителем (с водой, гидрофобной областью мембраны, с областью интерфейса мембрана–вода) отдельных остатков и/или участков молекул.

Расчет МГП на поверхности белка [32] выполняли для наиболее низкоэнергетических состояний, найденных для каждой из стартовых структур в присутствии мембраны. Двумерные МГП-карты готовили следующим образом (рис. 7). Конформации молекулы ЦТ А5 совмещали в пространстве, сохраняя их ориентацию относительно плоскости мембраны $|z| = 15$ Å. Методом наименьших квадратов рассчитывали координаты плоскости (В), равноудаленной от β -тяжей, образующих жесткий структурный каркас молекулы ЦТ А5. Данная плоскость делит множество точек молекулярной поверхности на два подмножества. Значения МГП, рассчитываемые в точках каждого из подмножеств, а также координаты C^α атомов, проецировали на плоскости А и А', параллельные плоскости В. Полученное двумерное распределение МГП визуализовали с помощью изопотенциальных контурных карт (МГП-карт). Данный подход позволяет наглядно представить характер распределения МГП в разных конформационных состояниях одного и того же белка.

Расчеты проводили на персональных компьютерах с процессорами AMD Athlon T-Bird 1.4 ГГц и рабочих станциях Silicon Graphics O2 R10000/SC/-195 МГц.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящая работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 01-04-48898, 00-15-97877), Министерства науки, промышленности и технологий РФ (государственный контракт № 43.073.1.1.1508 от 31.01.2002 г. “Молекулярное моделирование структуры и механизмов функционирования мембранных и мембрано-активных белков”), Российского фонда содействия отечественной науке (грант Е.Р.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumar T., Jayaraman G., Lee C., Arunkumar A., Sivaraman T., Samuel D., Yu C. // *J. Biomol. Struct. & Dyn.* 1997. V. 15. P. 431–463.
2. Fletcher J.E., Hubert M., Wieland S.J., Gong Q.H., Jiang M.S. // *Toxicon.* 1996. V. 34. P. 1301–1311.
3. Chiou S.H., Hung C.C., Huang H.C., Chen S.T., Wang K.T., Yang C.C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 206. P. 22–32.
4. Bilwes A., Rees B., Moras D., Menez R., Menez A. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 239. P. 122–136.
5. Aripov T.F., Gasanov S.E., Salakhutdinov B.A., Rozenstein A., Kamaev F.G. // *Gen. Physiol. Biophys.* 1989. V. 8. P. 459–474.
6. Chien K.-Y., Chiang C.-M., Hseu Y.-C., Vyas A., Gordon S., Wu W.-G. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 14473–14483.
7. Desormeaux A., Laroche G., Bougis P.E., Pezolet M. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 12173–12182.
8. Dubovskii P.V., Dementieva D.V., Bocharov E.V., Utkin Yu.N., Arseniev A.S. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 305. P. 137–149.
9. Dementieva D.V., Bocharov E.V., Arseniev A.S. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 263. P. 152–162.
10. White S.H., Wimley W.C. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1999. V. 28. P. 319–365.
11. Shai Y. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1462. P. 55–70.
12. Forrest L.R., Sansom M.S. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000. V. 10. P. 174–181.
13. Woolf T.B., Roux B. // *Proteins.* 1996. V. 24. P. 92–114.
14. Tieleman D.P., Berendsen H.J.C. // *Biophys. J.* 1998. V. 74. P. 2786–2801.
15. Woolf T.B. // *Biophys. J.* 1998. V. 74. P. 115–131.
16. Zhou F., Schulten K. // *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 1996. V. 25. P. 12–27.
17. Efremov R.G., Nolde D.E., Volynsky P.E., Chernyavsky A.A., Dubovskii P.V., Arseniev A.S. // *FEBS Lett.* 1999. V. 462. P. 205–210.
18. Tieleman D.P., Berendsen H.J.C. // *J. Chem. Phys.* 1996. V. 105. P. 4871–4880.

19. Efremov R.G., Nolde D.E., Vergoten G., Arseniev A.S. // *Biophys. J.* 1999. V. 76. P. 2460–2471.
20. Nolde D.E., Arseniev A.S., Vergoten G., Efremov R.G. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1997. V. 15. P. 1–18.
21. Нольде Д.Е., Волынский П.Е., Арсеньев А.С., Ефремов Р.Г. // *Биоорган. химия.* 2000. Т. 26. С. 131–142.
22. Efremov R.G., Volynsky P.E., Nolde D.E., Dubovskii P.V., Arseniev A.S. // *Biophys. J.* 2002. V. 83. P. 144–153.
23. Sun Y.-J., Wu W.-g., Chiang C.-M., Hsin A.-Y., Hsiao C.-D. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 2403–2413.
24. Singhal A., Chien K.-Y., Wu W.-g., Gordon S. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 8036–8045.
25. Дубинный М.А., Дубовский П.В., Уткин Ю.Н., Симонова Т.Н., Барсуков Л.И., Арсеньев А.С. // *Биоорган. химия.* 2001. Т. 27. С. 84–94.
26. von Freyberg B., Braun W. // *J. Comp. Chem.* 1991. V. 12. P. 1065–1076.
27. Berendsen H.J.C., van der Spoel D., van Drunen R. // *Comp. Phys. Comm.* 1995. V. 91. P. 43–56.
28. Darden T., York D., Pederson L. // *J. Chem. Phys.* 1993. V. 98. P. 10089.
29. Kabsch W., Sander C. // *Biopolymers.* 1983. V. 22. P. 2577–2637.
30. Hubbard S.J., Thornton J.M. 'NACCESS', Computer Program, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, 1993.
31. Metropolis N., Rosenbluth A.W., Teller A.H., Teller E. // *J. Chem. Phys.* 1953. V. 21. P. 1087–1092.
32. Efremov R.G., Vergoten G. // *J. Phys. Chem.* 1995. V. 99. P. 10658–10666.

Interaction of Cardiotoxin A5 with Membrane: Role of Conformational Heterogeneity and Hydrophobic Properties

A. G. Konshina[#], P. E. Volynsky, A. S. Arseniev, and R. G. Efremov

[#]Phone: +7 (095) 336-2000; e-mail: nastya@nmr.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

The hypothesis that local conformational differences of snake venom cardiotoxins (cytotoxins, CTs) may play a significant role in their interaction with membrane was tested by molecular modeling of the behavior of the CT A5 from the venom of *Naja atra* in water and at the water–membrane interface. Two models of the CT A5 spatial structure are known: the first was obtained by X-ray analysis and the second, by NMR studies in solution. A molecular dynamics (MD) analysis demonstrated that loop II of the toxin has a fixed Ω -like shape in water, which does not depend on its initial structure. Interaction of the experimentally derived (X-ray and NMR) conformations and MD-simulated conformations of CT A5 with the lipid bilayer was studied by the Monte Carlo method using the previously developed model of the implicit membrane. The following was found: (1) Unlike the previously studied CT2 from the venom of cobra *Naja oxiana*, CT A5 has only loops I and II bound to the membrane, with the involvement of a lesser number of hydrophobic residues. (2) A long hydrophobic area is formed on the surface of CT A5 due to the Ω -like shape of loop II and the arrangement of loop I in proximity to loop II. This hydrophobic area favors the toxin embedding into the lipid bilayer. (3) The toxin retains its conformation upon interaction with the membrane. (4) The CT A5 molecule has close values of the potential energy in the membrane and in an aqueous environment, which suggests a dynamic character of the binding. The results of the molecular modeling indicate a definite configuration of loops I and II and, consequently, a specific character of distribution of polar and apolar properties on the toxin surface, which turns out to be the most energetically favorable. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: conformational search, molecular dynamics, molecular modeling, Monte Carlo method, protein solvation model