

На правах рукописи

Терёшкина Ксения Борисовна

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА
ПЕПТИДНЫХ СТРУКТУР И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ
ИОННОГО КАНАЛА ГЛИЦИНОВОГО РЕЦЕПТОРА

Специальность 03.00.02. - "Биофизика"

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2006

Работа выполнена на кафедре биофизики биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, профессор
Шайтан Константин Вольдемарович

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Немухин Александр Владимирович
(химический факультет МГУ)

кандидат физико-математических наук
Балабаев Николай Кириллович
(ИМПБ РАН)

Ведущая организация: Институт химической физики
им. Н. Н. Семёнова РАН, г. Москва

Защита состоится " " _____ 2006 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова по адресу: 119992, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория "Новая".

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан: " " апреля 2006 г.

Учёный секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук,
профессор

Т. Е. Кренделева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последние годы при решении фундаментальных и прикладных задач молекулярной биоинженерии и биофизики активно используются методы молекулярного моделирования и молекулярного дизайна. При этом внимание уделяется всё более сложным и большим молекулярным системам, таким как белки-ферменты, мембранные белки, биомембраны и ионные каналы и др. Совершенно очевидно, что применение методов обычной равновесной молекулярной динамики к столь большим объектам встречает определенные затруднения, связанные с невозможностью за сколь либо реальное время изучить все возможные конформационные изменения в системе и получить таким образом статистически корректные результаты. Поэтому возрастает важность методов неравновесной молекулярной динамики, или управляемой молекулярной динамики (SMD), суть которых заключается в следующем. Над системой проводится серия численных экспериментов, в которых создаются специальные неравновесные условия (состояния) и изучается релаксация этих состояний. Рассматриваются серии релаксационных процессов с характерными временами до 10 нс. В результате становится возможным определение кинетических и релаксационных параметров системы, которые несут информацию о функциональном акте и связанных с ним конформационных перестройках. Это направление является перспективным, в частности, для исследования связи структуры и функционирования крупных молекулярных объектов таких, как мембранные белки, ионные каналы и др. Что весьма актуально с биологической точки зрения, т.к. ионные каналы играют ключевую роль в поддержании гомеостаза, передаче сигнала в возбудимых клетках, создания и поддержания мембранного потенциала в прокариотических и эукариотических клетках. Механизм их функционирования, в части ионной проводимости, во многом определяется строением мембранной части рецепторов. Эти же методы могут быть применены также и к другим сложным случаям. Следует отметить, что, несмотря на полезность метода управляемой молекулярной динамики, он существенно менее развит по сравнению с методом равновесной молекулярной динамики. Поэтому актуальным также является и развитие основ этого метода в применении к различным классам объектов, и установление качественных протоколов моделирования.

Целью работы является изучение механизмов миграции ионов сквозь канал мембранных рецепторов на основе разработки новых методических подходов и протоколов управляемой молекулярной динамики, построение струк-

туры канальной части глицинового рецептора в закрытом и открытом состояниях, исследование процессов переноса ионов при функционировании ионного канала глицинового рецептора, изучение влияния действия внешних сил, электростатических свойств канала и сольватированных комплексов ионов на динамику миграции ионов, а также разработка методов и программного обеспечения для анализа результатов вычислительных экспериментов.

Постановка задачи.

Для достижения этих целей необходимо было поставить и решить следующие основные задачи:

1. Отработать методические вопросы метода управляемой молекулярной динамики в части:
 - изучения влияния термостатов Берендсена, Нозе-Гувера, столкновительной и ланжевеновской динамики на поведение рассчитываемых систем, на энергетические и вероятностные характеристики системы;
 - сравнения параметров динамического поведения пептидных структур в средах с различной гидрофобностью;
 - вычисления методами квантовой химии высот потенциальных барьеров заторможенного вращения и парциальных атомных зарядов для уточнения параметров силового поля;
 - изучения влияния внешних сил и искусственных стерических препятствий на динамику макромолекул.
2. Реконструировать по гомологии структуру канальной части глицинового рецептора в закрытом состоянии.
3. Провести изучение динамики различных ионов и молекул воды внутри канала методом управляемой молекулярной динамики и установить возможное нахождение ворот канала, определяющих селективность и скорость проникновения ионов.
4. Определить путём направленных конформационных изменений вероятную структуру открытого канала глицинового рецептора и параметры взаимодействия интерьера открытого канала с гидратированными ионами.
5. Провести сравнительное исследование миграции через канал глицинового рецептора ионов и заряженных комплексов для установления соответствия расчётных и экспериментальных данных по подвижности.

Научная новизна:

Впервые

- получена модель канальной части, имеющей следующую первичную последовательность: MET-ASP-ALA-ALA-PRO-ALA-ARG-VAL-GLY-LEU-GLY-ILE-THR-THR-VAL-LEU-THR-MET-THR-THR-GLN-SER-SER-GLY-SER-ARG-ALA, закрытого канала глицинового рецептора.
- предложен метод изучения канальной части мембранных рецепторов с использованием стабилизирующего углеводородного кольца.
- построена полноатомная модель открытого канала глицинового рецептора. Впервые проведено сравнительное исследование миграции гидратированных ионов сквозь канал глицинового рецептора.
- проведено сравнительное изучение миграции ионов при различных напряжениях силового поля.
- разработан протокол управляемой молекулярной динамики для изучения миграции ионов сквозь пору мембранных каналов.

Для достижения этих результатов был впервые проведён следующий комплекс методических разработок:

- проведено сравнительное изучение динамики систем при использовании практически всех используемых термостатов: Берендсена, Нозе-Гувера, ланжевендовской и столкновительной динамики. Определено влияние термостатов на характер изменения распределений плотностей вероятностей и энергетических характеристик системы.
- проведен вычислительный эксперимент по сравнительному изучению влияния гидрофобности среды на динамические свойства всех 20 природных аминокислотных остатков.
- проведено сравнительное изучение динамики ноотропного агента СЕМАКС и его аналогов.
- проведено сравнение параметров цис-транс переходов в молекуле ретиналя в различных электронных состояниях методом управляемой молекулярной динамики.

Практическое значение работы. Разработанные методы, протоколы управляемой молекулярной динамики для изучения сложных систем и полученные данные по влиянию гидрофобности среды, аминокислотного состава, зарядов и других параметров на конформационную подвижность имеет практи-

ческое значение для развития методов молекулярного дизайна биологических функционально активных структур. Это может быть использовано при разработке новых лекарственных препаратов, проведении фундаментальных и прикладных исследований для определения связи структуры и функциональной активности биомолекул. По результатам работы было разработано и внедрено в процесс обучения молекулярной динамике студентов биологического факультета МГУ методическое пособие "Молекулярная динамика белков и пептидов", М.: Ойкос, 2004. – 103с. (К. В. Шайтан, К. Б. Терёшкина).

Достоверность результатов диссертации обеспечивается использованием универсальных законов и уравнений классической и квантовой механики и проведением тестовых расчётов систем, сравниваемых с экспериментальными данными.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на 4-ой Школе-конференции В.А.Фока по квантовой и компьютерной химии (Москва, 2001 г.), 5-ой Школе-конференции В.А.Фока по квантовой и компьютерной химии (Великий Новгород, 2002 г.), Международной конференции "Ломоносов-2002" (Москва, 2002 г.), Первой национальной конференции "Информационно-вычислительные технологии в решении фундаментальных научных проблем и прикладных задач химии, биологии, фармацевтики, медицины" (Москва, 2002 г.), 5-ом Международном конгрессе по математическому моделированию (Дубна, 2002 г.), 6-ой Школе-конференции В.А.Фока по квантовой и компьютерной химии (Великий Новгород, 2003 г.), 4-ом Европейском биофизическом конгрессе (Испания: Аликанте, 2003 г.), на семинаре лаборатории биологической физики Института биофизики Федерального университета Рио-де-Жанейро (Бразилия: Рио-де-Жанейро, 2003 г.), Международной конференции "Ломоносов-2004" (Москва, 2004 г.), 29-ом Конгрессе Европейского биохимического общества (Польша: Варшава, 2004 г.), Форуме молодых учёных при 29-ом Конгрессе Европейского биохимического общества (Польша: Варшава, 2004 г.), 9-ом Международном конгрессе по математическому моделированию (Нижний Новгород, 2004 г.), 3-ей Всероссийской Школе-Симпозиуме "Динамика и структура в химии и биологии" (Москва, 2005 г.), Международной конференции по классическому и квантово-динамическому моделированию в химии и биологической физике (Германия: Дрезден, 2005 г.), 30-ом Объединённом конгрессе Европейского биохимического общества и Международного союза биохимиков и молекулярных биологов (Венгрия: Будапешт, 2005 г.), Форуме молодых учёных при 30-ом Объединённом конгрессе Европейского биохимического общества и Международного союза биохимиков и молекулярных биологов (Венгрия: Вышеград, 2005 г.), 3-ем Съезде Общества биотехнологов

России им. Ю.А.Овчинникова (Москва, 2005 г.), Конференции молодых ученых "Системная биология и биоинженерия" (Звенигород, 2005 г.), Московской международной конференции "Биотехнология и медицина" (Москва, 2006 г.). Работа также докладывалась на семинарах кафедр биофизики и биоинженерии биологического факультета МГУ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 27 печатных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа (150 страниц) состоит из введения, 4 глав, выводов, списка литературы (203 ссылки), иллюстрирована 62 рисунками и содержит 20 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен литературный обзор по методам молекулярной динамики и применению метода к изучению динамики биологических объектов. Дан обзор по современным методам квантовой химии, используемым для дополнения силового поля AMBER-99. Приведены данные по сравнительному изучению термостатов и протокол молекулярной динамики, используемый в процессе исследования и дополняемый параметрами для управляемой молекулярной динамики. Литературный обзор по изучаемым объектам не вынесен в отдельную главу, а приводится далее по главам.

Во второй главе приведены результаты методических разработок по теме диссертации. Исследована динамика пептидов в средах с различной гидрофобностью. Проведены МД расчёты двадцати природных аминокислотных остатков и пяти форм модифицированного тирозина с различными положениями гидроксильных групп. Все аминокислотные остатки во избежание концевых эффектов были связаны с N-метиламином с C-конца и с ацетилом с N-конца. Изучались модели молекул в полноатомном приближении.

Вычислялись одномерные, двумерные (1) и трёхмерные распределения плотностей вероятностей по торсионным углам ϕ , ψ , и χ_1 и сечения Пуанкаре для всех сочетаний этих углов. Для оценки индивидуального динамического поведения торсионных углов вычислялись автокорреляционные функции специального вида (2).

$$P(\alpha_{k1}, \alpha_{k2}) = \int \dots \int P(\alpha_1, \dots, \alpha_N) \prod_{i \neq k1, k2} d\alpha_i \quad (1)$$

$$F_{xx} = \left\langle e^{ik(t)} e^{-ik(t+\tau)} \right\rangle \quad (2)$$

Здесь $k(t)$ - значение торсионного угла в момент времени t .

Для сравнительного анализа динамического поведения аминокислотных остатков проводился дисперсионный анализ. Использовалась Евклидова метрика для определения различий между картами уровней свободной энергии, для выявления однотипных объектов и классификации конформационных степеней свободы. Метрики для нахождения различий между двумерными картами (3) и автокорреляционными функциями (4) выбирались следующим образом:

$$d_{sr} = a^2 \sqrt{\sum_i (p_{r,i}(\varphi, \psi) - p_{s,i}(\varphi, \psi))^2} \quad (3)$$

$$d_{sr} = \frac{\sqrt{\int_0^\tau (f_r(t) - f_s(t))^2 dt}}{\max_i \int_0^\tau (f_i(t)) dt} \quad (4)$$

Здесь индексы r, s соответствуют двум разным аминокислотным остаткам, a – параметр разбиения, p – плотность вероятности, f – значение действительной части автокорреляционной функции, индексом i обозначена автокорреляционная функция, интеграл под которой имеет максимальное значение на рассматриваемом участке. Для построения кластерного дерева был применён алгоритм выбора минимальных расстояний.

Было установлено, что с точки зрения динамического поведения в подпространстве торсионных углов φ, ψ и χ_1 , все монопептиды природных аминокислотных остатков проявляют сходные свойства. Основные отличия выявляются для монопептидов пролина и глицина, связанные со спецификой структуры их боковых радикалов. Для всех монопептидов наиболее заселены области, соответствующие β -конформациям и правой α -спирали.

Присутствие растворителя сглаживает рельеф потенциальной поверхности и увеличивает набор вероятных конформаций при данных условиях. При переходе от неполярной (столкновительной) к полярной (метанол, вода) среде наблюдается увеличение доступного конфигурационного объёма (табл. 1). Для остатков с заряженными боковыми радикалами этот эффект наиболее выражен.

Различия в динамическом поведении монопептидов максимальны в столкновительной среде, при переходе к метанолу и водной среде они соответственно уменьшаются. Изменения при вариации растворителя в наименьшей степени испытывают монопептиды с небольшими боковыми радикалами. Цик-

лизация монопептида при образовании водородной связи между атомами кислорода ацильного остатка и водорода N-метильного остатка наиболее выражена в столкновительной среде.

Таблица 1 Эффективный объём в процентах от всего объёма подпространства торсионных углов ϕ , χ_1 и ψ . ΔM – изменение объёма при переходе метанол $\rightarrow$ столкновительная среда, ΔW – изменение объёма при переходе вода $\rightarrow$ столкновительная среда, ΔW_M – изменение объёма при переходе вода $\rightarrow$ метанол.

Монопептид	Столкновительная среда	Метанол	Вода	ΔM	ΔW	ΔW_M
ala	66.85	74.70	81.30	7.85	14.45	6.60
arg	42.54	51.97	57.93	9.43	15.39	5.96
asn	44.37	59.16	60.12	14.79	15.75	0.96
asp	21.27	31.99	49.54	10.72	28.27	17.55
cys	47.41	57.15	65.20	9.74	17.79	8.05
gln	54.69	59.73	62.42	5.04	7.73	2.69
glu	25.87	39.15	50.27	13.28	24.40	11.12
his	35.18	49.66	61.72	14.48	26.54	12.06
ile	35.99	41.12	45.68	5.13	9.69	4.56
leu	49.54	53.70	53.27	4.16	3.73	-0.43
lys	48.08	55.53	63.51	7.45	15.43	7.98
met	53.06	58.75	63.04	5.69	9.98	4.29
phe	48.76	60.20	62.93	11.44	14.17	2.73
pro	6.49	7.01	2.89	0.52	-3.60	-4.12
ser	65.73	64.00	69.92	-1.73	4.19	5.92
thr	39.57	42.62	50.38	3.05	10.81	7.76
trp	47.87	59.28	64.27	11.41	16.40	4.99
ty2	52.10	57.08	61.33	4.98	9.23	4.25
ty3	55.94	58.23	57.05	2.29	1.11	-1.18
tyc	57.08	56.08	59.22	-1.00	2.14	3.14
tyo	49.44	53.90	54.56	4.46	5.12	0.66
tyr	52.65	57.56	60.31	4.91	7.66	2.75
tyv	52.55	56.36	63.16	3.81	10.61	6.80
val	37.47	44.93	46.26	7.46	8.79	1.33

В ряду модифицированных тирозинов дополнительная гидроксильная группа замедляет конформационные переходы по углу χ_1 , а присутствие дополнительной шарнирной группы CH_2 , напротив, делает движение более свободным. Эти явления наиболее заметны в столкновительной среде. В метаноле и водном окружении наиболее замедлена динамика конформационных переходов по углу χ для тирозина без шарнирной метильной группы в боковом радикале.

В третьей главе представлены результаты применения метода управляемой молекулярной динамики к процессу изомеризации ретиналя. Методами Хартри-Фока с базисом 6-31ГФ и конфигурационного взаимодействия прово-

дится изучение барьеров вращения торсионных углов полиеновой цепи ретиналя в основном и возбуждённых состояниях. Методом конфигурационного взаимодействия получены барьеры вращения по связям, участвующим в изомеризации в родопсине и бактериородопсине. Предварительно были проведены расчёты этилена и бутадиена с целью определения метода расчёта и базиса для разложения молекулярных орбиталей, оптимального по соотношению соответствия результатов с экспериментами и возможности их использования при существующих компьютерных мощностях.

Полученные данные были использованы при параметризации силового поля для ретиналь-содержащих систем. При сравнении конформаций ретиналя, соответствующей минимуму потенциальной энергии, с конформацией внутри белкового окружения было показано наличие напряжения в цепи ретиналя внутри белка. Методом управляемой молекулярной динамики было проведено изучение динамики ретиналя. Для имитации напряжения полиеновой цепи ретиналя в белковом окружении концы ретиналя фиксировались на расстояниях от 5 до 14Å. Было установлено, что напряжения полиеновой цепи и распределение барьеров внутреннего вращения способствуют появлению коллективной степени свободы, вовлекающий в процесс изомеризации сразу две двойные связи. Таким образом, результативное взаимодействие ретиналя и белкового окружения делает эффективность процесса очень высокой (квантовый выход более 67).

Четвёртая глава посвящена изучению динамики функционирования ионного канала глицинового рецептора. С помощью приложений Swiss-Model, 3D-JIGSAW и др. было проведено моделирование структуры канальной части глицинового рецептора по гомологии. Наряду с этим проводилось построение модели канала на основании данных о трёхмерной структуре TM2-спирали $\alpha 1$ -субъединицы. С помощью специальной программы TM2-спираль была повернута на 0°, 72°, 144°, 216° и 288° вокруг оси поры, затем были сделаны радиальные смещения. Предварительно спирали были сориентированы вдоль оси Z. Особое внимание уделялось расположению аминокислотных остатков, играющих ключевую роль в процессе прохождения ионов. Для проверки правильности полученной модели каждая спираль TM2-спираль поворачивалась на 5-20° относительно своей оси и проверялось расположение ключевых аминокислотных остатков и взаимная ориентация спиралей. Среди различных структур, полученных по гомологии, были выбраны модели, основанные на данных для никотинового ацетилхолинового рецептора из нервно-мышечного синапса (PDB: 1OED). Эти модели были использованы для получения структуры канала глицинового рецептора. Предположительно была получена структура закрыто-

го канала. Для устранения краевых эффектов N-конец каждой α -спирали был связан с ацетилом, C-конец – с н-метиламином.

Были проведены исследования прохождения ионов и комплексов сквозь канал при различных условиях. Во всех расчётах использовался метод управляемой молекулярной динамики, включающий в себя стандартный протокол молекулярной динамики, дополненный введением сил, действующих на ионы и комплексы (табл. 2).

Таблица 2 Протокол молекулярной динамики.

Параметр	Значение
Потенциальное поле	AMBER-99
“Длина траектории”	до 20 нс
Термостат	столкновительный
Масса виртуальных частиц	$m=18$ а.е.м.
Частота столкновений виртуальных частиц с атомами рассчитываемой молекулы	$\nu=55$ пс ⁻¹
Температура термостата	300K
Температура релаксации в начальный период расчёта	500K
Режим фиксации атомов	включён
Диэлектрическая проницаемость среды	варьировалась
Радиус обрезания для электростатических взаимодействий	$R_{el}=2$ нм
Интервал обрезания для взаимодействий Ван-дер-Ваальса	$R_{vdw}=1,5 - 1,6$ нм
Алгоритм численного интегрирования	Верле
Метод определения начальных скоростей атомов	генератор случайных чисел по распределению Максвелла
Шаг интегрирования	1 фс
Шаг записи в траекторный файл	0,1 пс
Шаг создания файла контрольной точки	0,1 пс
Сила, действующая на атом или комплекс	варьировалась

Силы, прикладываемые к атому или комплексу, были направлены вдоль нормали мембраны с внеклеточной стороны во внутриклеточную. Параметры для иона Cl^- соответствовали параметрам атома IM в справочнике AMBER99. Все расчёты были проведены с помощью программного комплекса PUMA. Силовые константы для валентных связей, валентных углов, торсионных углов

гидратированных комплексов ионов находились с помощью программы GAMESS. Проводилась оптимизация геометрии системы методом Хартри-Фока с разложением молекулярных орбиталей по базису 6-31ГФ**. Парциальные заряды на атомах находились методом электростатического потенциала. В некоторых случаях для сравнения были использованы заряды, найденные методом Малликена.

Для контрольных расчётов ионной проводимости созданных моделей канала значение диэлектрической проницаемости среды бралось равным двум, значение силы составляло 6 ккал/(моль·Å). Это связано с тем, что при таком значении силы возможно прохождение ионов сквозь закрытый канал без потери его селективности. Изучалась миграция ионов Cl^- и Na^+ , гидратированных шестью молекулами воды. Ниже приведены графики миграции ионов сквозь пору рецепторов, полученных по гомологии (рис. 1). В первой модели (рис. 1а) радиус канала в самом узком месте составляет 2,2Å, во второй модели (рис. 1б) – 2,5Å; модели отличаются поворотом спиралей. На обоих рисунках заметно, что время прохождения иона Cl^- в 3÷4 раза больше времени прохождения иона Na^+ (на втором рисунке обозначен как Na_1^+). Для того чтобы исключить возможные артефакты, связанные с парциальными зарядами на атомах, во второй модели был также проведён расчёт миграции иона натрия с увеличенным в 1,5 раза по абсолютной величине зарядом (обозначен как Na_2^+). Однако существенного уменьшения скорости иона в канале добиться не удалось.

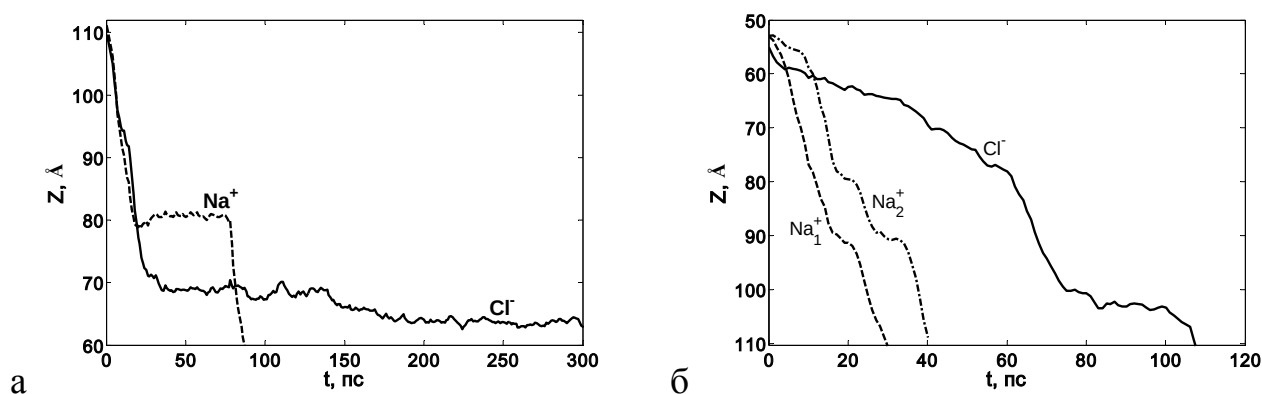
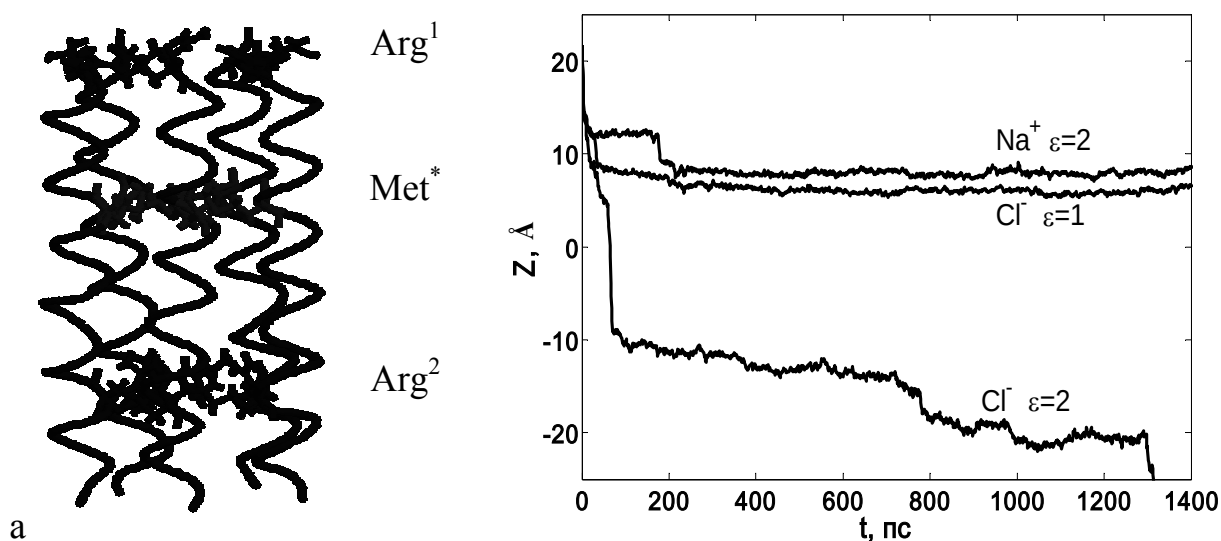


Рис. 1 Миграция ионов Cl^- и Na^+ сквозь пору канала глицинового рецептора в моделях канала, полученных по гомологии с ацетилхолиновым рецептором. См. объяснения в тексте.

Таким образом, было установлено, что модели, полученные по гомологии, нуждаются в серьёзной корректировке. Одним из факторов изменения селективности может служить то обстоятельство, что в полученных моделях боковые радикалы остатков аргинина, играющие предположительно ключевую

роль в процессах миграции ионов, не обращены внутрь канала. Указанные недостатки модели были устранены после изменения геометрии α -спиралей на основе данных о трёхмерной структуре α -спиралей вторых трансмембранных доменов глицинового рецептора (PDB: 1MOT). Радиус канала в узкой части был взят 2,1Å. На рис. 2а показаны графики движения ионов Cl^- и Na^+ в модели закрытого канала. Замедление иона Na^+ происходит на уровне первого аргининового кольца; затем ион полностью останавливается в области канала с обращёнными внутрь боковыми радикалами остатков метионина. Ион хлора почти не чувствителен к присутствию первого аргининового кольца при больших силах. Заметным потенциальным барьером служит второе аргининовое кольцо. Для сравнения показана динамика прохождения иона Cl^- при $\epsilon=1$. Ион останавливается в области остатков метионина и треонина. Тот же эффект был обнаружен для ионов I^- , Br^- , F^- , модельного иона Cl^{2-} , K^+ , Li^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Rb^+ . Следует заметить, что молекулы воды могут проходить через канал при действии на порядок меньших сил, что может говорить об электростатической природе ворот канала.



MDAAPAR²VGLGITTVLTM*TTQSSGSR¹A

б MDAA-ER²VGLGITTVLTM*TVQSSGSR¹A

Рис. 2 Миграция ионов Cl^- и Na^+ сквозь пору канала глицинового рецептора в модели открытого канала: показан общий вид рецептора, обозначены остатки Arg (первое - вверху и второе - внизу аргининовые кольца) и Met (а); выравнивание последовательностей TM2-домена глицинового рецептора дикого типа (верхняя последовательность) и рецептора с мутацией STM (б). Индексами ¹, ² и * обозначены первое, второе аргининовые и метиониновое кольцо соответственно.

По гомологии с моделью закрытого канала была построена модель канала глицинового рецептора с мутацией STM (рис. 2б).

При моделировании открытого канала были проведены повороты α -спиралей относительно их оси на 20° . Затем были проведены повороты спиралей друг относительно друга с образованием суперспирали. Радиальные смещения после поворота спиралей были сделаны таким образом, чтобы диаметр канала стал равным $5,2\text{\AA}$. Измерения радиуса канала проводились в программе HOLE. Структура TM2-спиралей были скорректирована на основании данных PDB: 1VRY. Эта запись содержит данные о структуре второго и третьего трансмембранных доменов $\alpha 1$ -субъединицы глицинового рецептора человека. При построении модели рецептора были использованы только второй и третий трансмембранные домены, перед проведением расчётов третий трансмембранный домен был удалён. Из имеющихся в файле PDB:1VRY 20 моделей были выбраны первая и шестая модели, наиболее сильно отличающиеся ориентацией верхних и нижних частей спиралей. В качестве конечной была выбрана структура, основанная на первой модели из файла PDB:1VRY. Изучалось влияние различных факторов на динамику ионов.

На рис. 3 представлен график зависимости миграции иона Cl^- вдоль оси канала при различных значениях диэлектрической проницаемости среды (ϵ) под действием силы $\vec{F} = -5\vec{z}$. Кривая, соответствующая расчёту с $\epsilon=1$ не показана, так как на приведённом интервале времён она совпадает с кривой, соответствующей $\epsilon=2$. Видно заметное увеличение времени прохождения иона при переходе от $\epsilon=2$ к $\epsilon=3$, связанное с ослаблением электростатических взаимодействий между аргининовыми кольцами ($z \approx 8$ и $20\text{\AA}$) и ионом. Дальнейшее увеличение диэлектрической проницаемости среды приводит к сильному ослаблению ($\epsilon=4; 5$) и полному исчезновению ($\epsilon=6$) вклада электростатических взаимодействий в динамику иона. При $\epsilon=6$ и выше скорость иона не изменяется при выходе из канала и движении в столкновительной среде. Похожую картину можно наблюдать при изменении силы, действующей на ион (рис. 3б-г), здесь $\epsilon=2$.

На рис. 3в показан общий вид графика. Видно, что при силах, больших $5\text{ ккал}/(\text{моль}\cdot\text{\AA})$ (ток хлора направлен из внеклеточной области внутрь клетки) и меньших $-6\text{ ккал}/(\text{моль}\cdot\text{\AA})$ (обратный ток) зависимость скорости иона от приложенной силы описывается прямой линией. В случае большой по модулю силы происходит быстрый отрыв гидратной оболочки иона. При силах около $5\text{ ккал}/(\text{моль}\cdot\text{\AA})$ по модулю ион становится нечувствительным к заряженным атомам внутри канала. Кривая зависимости скорости иона от силы не симмет-

рична относительно нуля. При силах,двигающих ион внутрь канала, наблюдается более резкое повышение скорости иона Cl^- . Этот эффект связан с процессом отрыва гидратной оболочки иона. При уменьшении радиуса канала с $2,6 \text{ \AA}$ (рис. 3г, сплошная линия) до $2,3 \text{ \AA}$ (пунктирная линия) скорость Cl^- уменьшается. В случае периодической силы (рис. 3б) время прохождения иона определяется начальным значением силы, частотой и амплитудой.

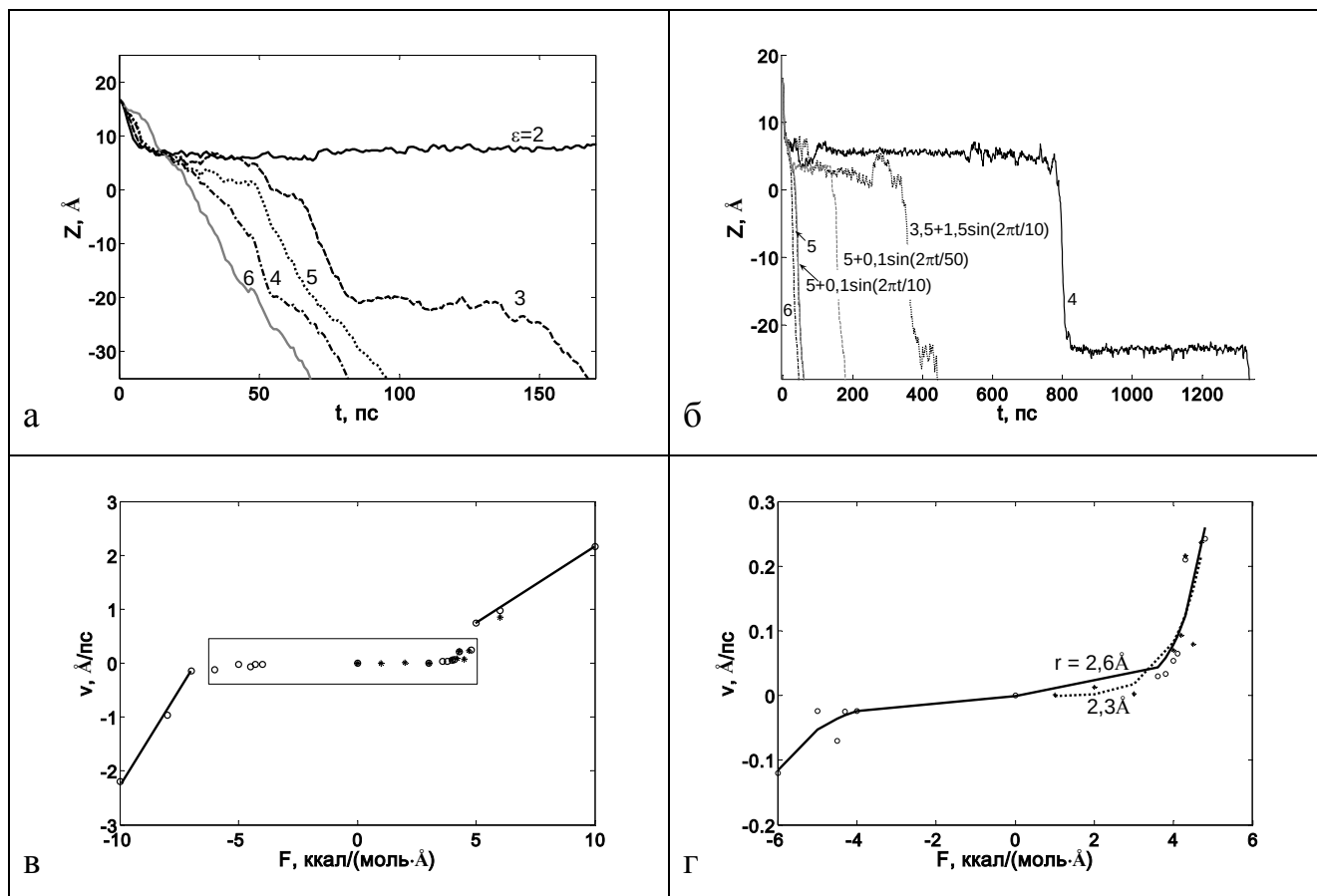


Рис. 3 Зависимость миграции иона Cl^- от времени: а) при различных значениях диэлектрической проницаемости среды; б) при постоянной и периодической силах. Зависимость скорости движения иона Cl^- от приложенной силы в каналах диаметра и $2,3 \text{ \AA}$: в) для канала радиуса $2,6 \text{ \AA}$ показаны прямолинейные участки, г) подробная картина при малых силах: пунктирная линия – для канала $2,6 \text{ \AA}$, сплошная линия – для канала $2,3 \text{ \AA}$.

На рис. 4 представлены данные по коэффициентам диффузии ионов, рассчитанным при разных действующих на ион силах, диэлектрическая проницаемость среды для приведённых расчётов была взята равной двум. Коэффициент диффузии рассчитывался согласно уравнению Эйнштейна:

$$D = \frac{kT}{\gamma}$$

Здесь γ – коэффициент трения: $\gamma = \frac{F}{\langle v \rangle}$,

где $\langle v \rangle$ – средняя скорость комплекса, F – действующая сила.

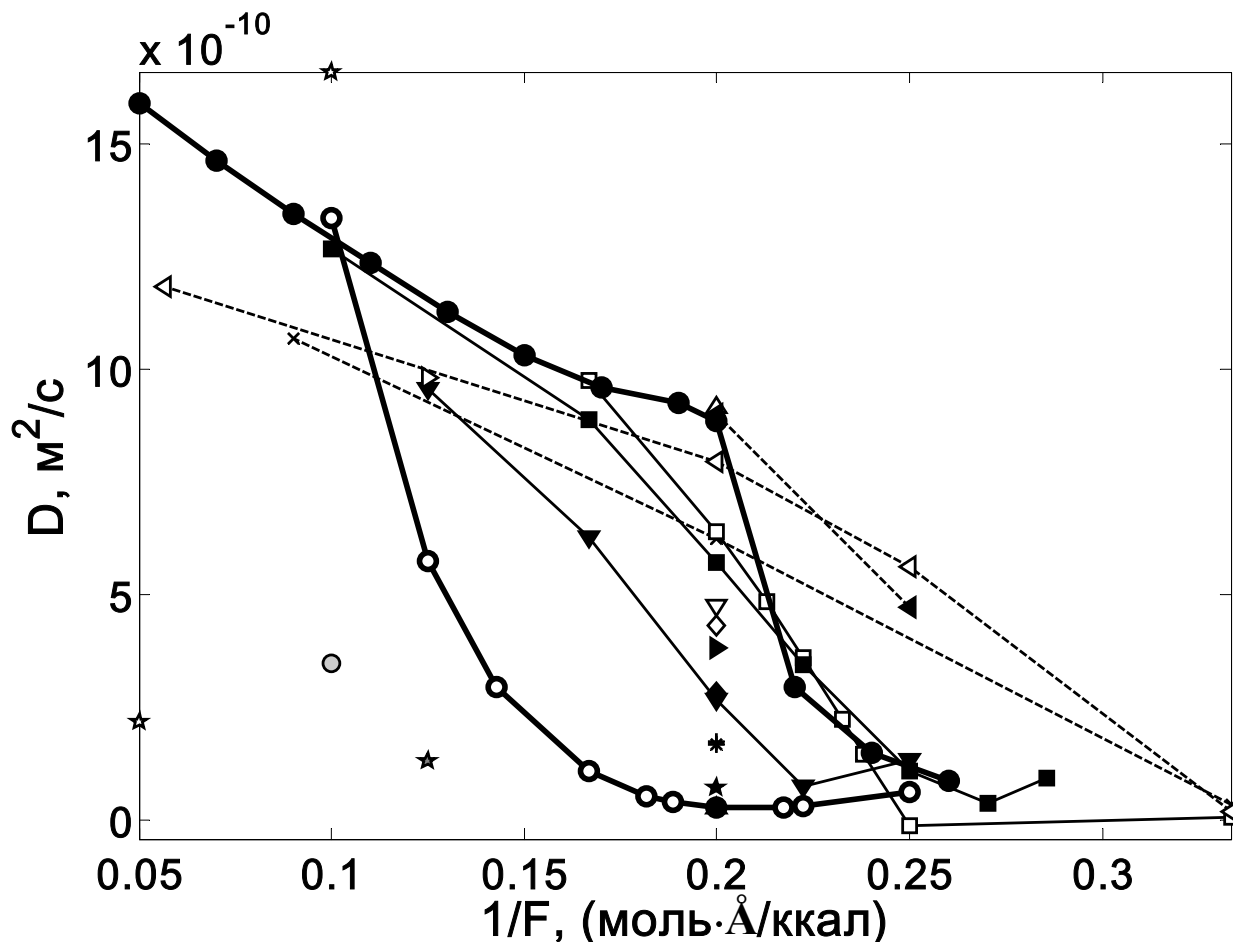


Рис. 4 Зависимость коэффициентов диффузии ионов от величины, обратной действующим силам. Приведённые данные соответствуют расчётам гидратированных ионов с двумя вариантами зарядов атомов в молекулах воды гидратной оболочки (М – расчёта по Малликену, Е – с помощью метода электростатического потенциала) в каналах радиусов 2,3 Å (r) и 2,6 Å (R): • – BF_4^- (M,r); × – Br^- (M,r); + – Br^- (E,r); * – Br^- (E,R); □ – Cl^- (M,r); ○ – Cl^- (E,R, обратный ток); ■ – Cl^- (E,r); ● – Cl^- (E,R); ★ – $\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_2^-$ (E,r); ▼ – Cl^- (E,r, начальная точка – на уровне первого кольца Arg); ▷ – Cl^- (M,r, заряд $q=-0.852$); ► – Cl^- (M,r, параметры потенциала Леннард-Джонса соответствуют CCl_4); △ – F^- (M,r); ▲ – HCO_2^- (M,r); ◁ – I^- (M,r); ◄ – I^- (M,R); ▽ – I^- (E,r); ☆ – Na^+ (M,r); ★ – Na^+ (M,R); ☆ – Na^+ (E,R); ◇ – SCN^- (M,r); ♦ – SCN^- (M,R). Сплошными линиями показано изменение коэффициентов диффузии для иона хлора.

Коэффициент диффузии ионов сквозь пору канала зависит как от эффективного заряда иона, так и от абсолютного значения эффективных зарядов на атомах воды гидратной оболочки. Наблюдается также зависимость от радиуса

канала. В среднем, коэффициент диффузии ионов в более узком канале ниже. Диффузия иона Cl^- происходит быстрее по направлению внутрь клетки. В случае остановки иона в области первого аргининового кольца дальнейшее продвижение иона замедляется в среднем в 2,2 раза. При силе $F=5$ ккал/(моль·Å) коэффициент диффузии Cl^- , определяемый по формуле Эйнштейна, наиболее близок к экспериментальному и составляет $0.81 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$. Увеличение силы выше некоторого предела увеличивает эффективный коэффициент диффузии, по-видимому, за счет образования неравновесного поля деформаций в канале (среде).

На основании выражения для оценки проводимости канала:

$$g_{\max}(c) = e \cdot F \cdot \pi \cdot r_0 \cdot D \cdot \frac{c}{kT},$$

где e – заряд электрона, F – постоянная Фарадея, k – постоянная Больцмана, T – температура, D – коэффициент диффузии, r_0 – эффективный радиус канала, был получен следующий ряд проводимостей для открытого канала глицинового рецептора: $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$, который согласуется с экспериментальными данными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанные методы и протоколы управляемой молекулярной динамики позволяют получить новую информацию о динамике и функционировании сложных молекулярных систем. Конструирование мембранной части глицинового рецептора по гомологии с ацетилхолиновым рецептором и изучение прохождения ионов Na^+ и Cl^- показало, что при воссоздании структуры канала глицинового рецептора (сформированного пятью α -спиралями) необходимо так поворачивать α -спирали друг относительно друга, чтобы внутрь канала были экспонированы положительно заряженные остатки. Это согласуется с имеющимися экспериментальными данными по проводимости глициновых рецепторов, мутантных по данным аминокислотным остаткам. В закрытом состоянии канала α -спирали расположены параллельно друг другу. Переход канала из закрытой в открытую конформацию происходит при повороте каждой α -спирали на угол порядка 20° с образованием суперспирали.

В закрытом состоянии канала торможение ионов происходит за счёт двух составляющих: электростатического взаимодействия иона с заряженными боковыми группами и стерических препятствий. Миграции ионов препятствуют

два кольца, составленных из боковых радикалов аминокислотных остатков, экспонированных внутрь канала. Это положительное кольцо из остатков аргинина (диаметр поры в этом сечении $4\text{\AA}$) и нейтральное кольцо из остатков метионина (диаметр поры в данном сечении $3\text{\AA}$). В открытом состоянии канала внутрь также экспонированы два положительно заряженных кольца из остатков аргинина. Однако диаметр канала на уровне колец составляет $5,1 \div 5,2\text{\AA}$, что согласуется с данными по проводимости канала для различных анионов.

Отрицательные ионы теряют гидратную оболочку при взаимодействии с положительно заряженными остатками первого кольца. Показано также, что миграция положительных ионов не происходит дальше уровня первого кольца за счёт сильного электростатического отталкивания. Модельными вычислительными экспериментами установлено, что динамика прохождения ионов через канал чувствительна к достаточно тонкому балансу электростатических взаимодействий. Характерное время прохождения отрицательных ионов сквозь пору канала зависит как от эффективного заряда иона, так и от абсолютного значения эффективных зарядов на атомах воды гидратной оболочки. При прохождении ионов через открытый канал средняя скорость прохождения иона возрастает с увеличением параметра диэлектрической проницаемости. Начиная с $\epsilon=4$ транспорт иона Cl^- становится нечувствителен к заряженным атомам внутри канала.

Наиболее хорошее совпадение расчётной проводимости канала с имеющимися экспериментальными данными наблюдается в силовом поле AMBER99 при использовании столкновительного термостата, $F=3 \div 5$ ккал/(моль· $\text{\AA}$), $\epsilon=2$. При амплитуде внешнего силового поля $F=5$ ккал/(моль· $\text{\AA}$) и $\epsilon=2$ коэффициент диффузии наиболее близок к экспериментальному и составляет $0.81 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$. Полученный ряд проводимости для различных ионов при этих параметрах МД протокола имеет вид $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$, который полностью совпадает с экспериментальными данными.

На основании вышеизложенных результатов можно сделать следующие выводы.

ВЫВОДЫ

1. В закрытом состоянии канала глицинового рецептора α -спирали расположены параллельно друг другу, внутрь канала экспонированы положительно заряженные остатки аргинина. Переход канала из закрытой в открытую конформацию происходит при повороте каждой α -спирали на угол порядка 20° с образованием суперспирали.

2. Торможение ионов в закрытом состоянии канала происходит за счёт двух составляющих: электростатического взаимодействия иона с заряженными боковыми группами (остатки аргинина) и стерических препятствий (остатки метионина).
3. В открытом состоянии диаметр канала на уровне аргининовых колец составляет $5,1 \div 5,2 \text{ \AA}$, что согласуется с данными по диаметру различных анионов, проходящих через канал. При взаимодействии с положительно заряженными остатками первого кольца отрицательные ионы теряют гидратную оболочку и проходят сквозь канал, положительных ионы – не могут преодолеть этот барьер.
4. Динамика прохождения ионов через канал чувствительна к балансу электростатических взаимодействий. При прохождении ионов через открытый канал средняя скорость прохождения иона возрастает с увеличением параметра диэлектрической проницаемости среды. Начиная с $\epsilon=4$ движение иона Cl^- становится нечувствительным к небольшим вариациям атомных зарядов внутри канала.
5. При установленных параметрах МД протокола: силовое поле AMBER99, столкновительный термостат, $F=5 \text{ ккал}/(\text{моль} \cdot \text{\AA})$, $\epsilon=2$ коэффициент диффузии наиболее близок к экспериментальному и составляет $0.81 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$, а полученный ряд проводимости для различных ионов при этих параметрах имеет вид $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$, который полностью совпадает с экспериментальными данными.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шайтан К. В. , Терёшкина К. Б. – Молекулярная динамика белков и пептидов: Учебно-методическое пособие. М.: Ойкос – 2004 – 103с.
2. Шайтан К. В., Беляков А. А., Леонтьев К. М., Сарайкин С. С., Михайлюк М. Г., Егорова К. Б., Орлов М. В., Геометрия энергетической поверхности и конформационная динамика: от углеводов - к белкам и пептидам, // Хим.физ., 2003. – Т. 22. – №2. – С. 57-68.
3. Egorova K. B., Shaitan K. V., Ermilov A. Y. – Molecular Dynamics of Strained Retinal in Various Electronic States // International Journal of Quantum Chemistry. – 2004. – V. 94 – P. 219-225.
4. Shaitan K. V., Tereshkina K. B. – Molecular Dynamics of Small Peptides Using Ergodic Trajectories. In: Bioinformatics of Genome Regulation and Structure II (N. Kolchanov and R. Hofstaedt, eds.), Springer Science+Business Media. – 2005. – P. 271-284.

5. Терёшкина К. Б., Шайтан К. В., Левцова О. В., Голик Д. Н. – Молекулярная динамика олигопептидов 6. Сравнительное изучение сечений Пуанкаре монопептидных структур в средах с различной гидрофобностью. // Биофизика. – 2005. – Т. 50. – № 6. – С. 974-985.
6. Шайтан К. В., Турлей Е. В., Голик Д. Н., Терешкина К. Б., Левцова О. В., Федик И. В., Шайтан А. К., Кирпичников М. П. – Молекулярная динамика и дизайн био- и наноструктур // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. – 2005. – Т. 1. – Вып. 1. – С. 66-78.
7. Шайтан К. В., Турлей Е. В., Голик Д. Н., Терешкина К. Б., Левцова О. В., Федик И. В., Шайтан А. К., Ли А., Кирпичников М. П. – Динамический молекулярный дизайн био- и наноструктур // Российский химический журнал. – 2006. – Т. 50. Вып. 2. С. 53-65.
8. Шайтан К. В., Турлей Е. В., Голик Д. Н., Терешкина К. Б., Левцова О. В., Федик И. В., Шайтан А. К., Кирпичников М. П. – Неравновесная молекулярная динамика био- и наноструктур // Химическая физика. – 2006. Т. 25. № 7.
9. Egorova K. B., Shaitan K. V. – Ab initio Simulation of Internal Rotation in Protonated Retinal. // Abstracts of the 4-th Electronic Session of the V.A. Fock School on Quantum and Computational Chemistry. Novgorod-the-Great, 2001. – <http://194.226.222.41/fock/proceedings/4/470/retinal.htm>.
10. Egorova K. B., Shaitan K. V., Ermilov A. Yu.. – The Effect of Protonation on Internal Rotation in Retinal. // Abstracts of the 5-th session of the V.A. Fock School on Quantum and Computation Chemistry. Novgorod-the-Great. – 2002. – P. 87.
11. Егорова К. Б., Шайтан К. В. – О физических основах функционирования молекулярных машин на примере ретиналя. // Первая Национальная Конференция “Информационно-вычислительные технологии в решении фундаментальных научных проблем и прикладных задач химии, биологии, фармацевтики, медицины”. Сборник тезисов. Москва. – 2002. – С. 62-63.
12. Egorova K. B., Shaitan K. V. – Molecular Dynamics of the Quasi-Carnot Cycle for Retinal Isomerization Molecular Machine. // Proceedimngs of the V International Congress on Mathematical Modeling. Book of Abstracts. Moscow. – 2002. – V. 2. – P. 231.
13. Egorova K. B., Ermilov A. Yu., Shaitan K. V. – Isomerization of unsaturated molecules in various electronic states by the example of butadiene and retinal. // Proceedimngs of the 6-th Session of the V.A. Fock School on Quantum and Computational Chemistry. Velikiy Novgorod. – 2003. – P. 115.

14. Egorova K. B., Shaitan K. V. – Retinal Isomerization in Terms of Quantum Chemistry and Molecular Dynamics // *European Biophysics Journal*. V. 32.(3). – 2003. – P. 214.
15. Егорова К. Б., Левцова О. В. – Сравнительное изучение динамического поведения аминокислотных остатков в воде, метаноле и столкновительной среде // Сборник тезисов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2004". М.: МГУ. – 2004. – Т. 1. – С. 14.
16. Егорова К. Б. – Молекулярная динамика трансмембранных доменов TM2 альфа субъединицы глицинового рецептора и бета 2 субъединицы ацетилхолинового рецептора // Сборник тезисов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2004". М.: МГУ. – 2004. – Т. 1. – С. 15.
17. Левцова О. В., Егорова К. Б. – Кинематика конформационных переходов природных аминокислотных остатков // Сборник тезисов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2004". М.: МГУ. – 2004. – Т. 1. – С. 19-20.
18. Egorova K. B., Shaitan K. V. – Dynamic Properties of Natural Aminoacids Residues (a comparative study) // *FEBS J.*, 2004. – V. 271. – Supp. 1. – P.63.
19. Egorova K. B., Shaitan K. V. – Dynamic Properties of Natural Aminoacids Residues (a comparative study) // *FEBS Forum for Young Scientists, Abstract book*, Warsaw, 2004. – P.15.
20. Egorova K. B., Levtsova O. V., Shaitan K. V. – Aminoacid Residues in Water, Simulated Water and Methanol Environment (a Comparative Molecular Dynamic Study) // *Proceedimngs of the VI International Congress on Mathematical Modeling*, Nizhny Novgorod, 2004. – P.495.
21. Tereshkina K. B., Shaitan K. V. – Ionic migration through glycine channel // *FEBS Journal*, 2005. – V. 272 (s1). – C1-066P.
22. Tereshkina K. B., Shaitan K. V. – Ionic migration through glycine channel // *FEBS Forum for Young Scientists: Abstracts*, Visegrad, 2005. – P.122.
23. Tereshkina K. B., Shaitan K. V. – Molecular dynamics of migration of ions and complexes through the glycine receptor TM2 domain // *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2005. – V. 34(6). – P. 656.
24. Шайтан К. В., Терешкина К. Б., Турлей Е. В., Левцова О. В., Ли А., Голик Д. Н. – Методы управляемой динамики для молекулярного дизайна сложных мембранных структур // *Материалы третьего съезда Общества Биотехнологов России им. Ю. А. Овчинникова*, Макс Пресс, Москва, 2005. – С.26.

25. Ли А.-Б., Терешкина К. Б., Шайтан К. В.– Механизм открытия канала ацетилхолинового рецептора // Сборник тезисов международной школы-конференции молодых ученых "Системная биология и биоинженерия", 2005. – С.108.
26. Терёшкина К. Б., Шайтан К. В.– Сравнительное изучение динамического поведения СЕМАКСА и его аналогов // Материалы Московской международной конференции "Биотехнология и медицина", 2005. – С.50.
27. Щука Т. В., Терешкина К. Б.– Сравнительное изучение молекулярной динамики антимикробных пептидов буфорина и магаинина // Сборник тезисов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2006". М.: МГУ. – 2006. – С. 259.