

ПОСТРОЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МОДЕЛИ ФРАГМЕНТА ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЫ В ГЕЛЕВОМ И ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ

Зленко Д.В., Красильников П.М.

Построена модель липидной мембраны в жидкокристаллическом и гелевом состоянии. Модель жидкокристаллического состояния адекватно воспроизводит геометрические параметры мембраны, упаковку липидов и параметры подвижности молекул. Модель гелевого состояния бислоя воспроизводит геометрические параметры реальной мембраны и упаковку липидов. Представлены новые методы расчета параметров подвижности молекул фосфолипидов в плоскости бислоя.

Введение. В настоящее время, благодаря интенсивному развитию вычислительной техники, все более активно используются методы компьютерного моделирования сложных систем, в том числе биологических макромолекул и их ансамблей. Одной из таких систем являются клеточные липидные мембраны, представляющие собой бислойные молекулярные пленки, построенные из липидных молекул [1, 2]. Существенное значение в функционировании биомембран имеет фазовое состояние липидного бислоя, в частности гелевое и жидкокристаллическое [1, 2]. Детальное экспериментальное исследование различных фазовых состояний мембраны наталкивается на существенные трудности. В связи с этим, для изучения липидных мембран большое значение приобретают методы численного моделирования, в частности метод молекулярной динамики (МД [3-5]).

В настоящей работе мы предприняли попытку создания корректной молекулярной модели фрагмента бислойной липидной мембраны, позволяющей изучать свойства мембран в экспериментах *in silico*. Создание адекватной, то есть устойчивой во времени и воспроизводящей экспериментально измеренные величины, модели липидного бислоя является актуальной задачей молекулярной биологии, так как использование только таких моделей позволяет получать значимые результаты.

Молекулярнодинамические расчеты. Модельная система состоит из 48 молекул дистеароилфосфатидилхолина (ДСФХ) и 1759 молекул воды (рис.1). Для создания адекватной модели липидной мембраны прежде всего необходимо создать полноатомную модель отдельной молекулы липида, так как именно корректная модель молекулы липида является базовым элементом молекулярной модели бислоя. Такая полноатомная, с явно заданными атомами водорода, модель молекулы ДСФХ была создана нами с использованием пакета программ для квантово-химических расчетов PC GAMESS [6, 7]. Методы квантовой химии использовались для расчета параметров жесткости модели молекулы липида, а так же для расчета эффективных зарядов атомов. Использование полноатомных моделей необходимо, так как структура мембраны во многом определяется свойствами гидрофобной области бислоя [1, 2]. При описании взаимодействия

ацильных хвостов липидных молекул друг с другом нельзя пренебречь взаимодействием диполей С-Н связей, тем не менее, неполноатомные модели используются [8, 9]. Такой подход частично оправдывается экономией вычислительных ресурсов, но является более грубым. В связи с этим мы использовали полноатомную модель молекул ДСФХ. Созданные модельные молекулы липидов были уложены в бислойную гексагональную структуру [1], при помощи программ собственной разработки. Для воды была использована модель *tip4p*, в которой имеется дополнительная виртуальная частица, описывающая неподеленные электронные пары атома кислорода, что необходимо для корректного образования водородных связей в модельной системе.

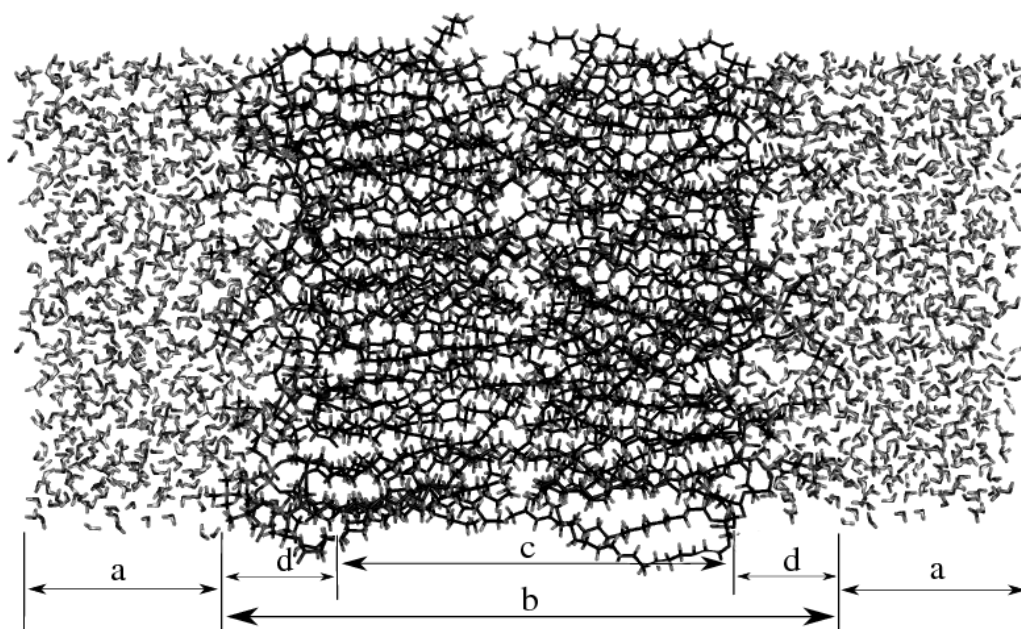


Рис 1. Общий вид молекулярной модели участка липидной мембраны в жидкокристаллическом состоянии, окруженной водой. Модельная система состоит из 48 молекул дистеароилфосфатидилхолина и 1759 молекул воды. На рисунке отмечены: *a* – вода ($\sim 20 \text{ \AA}$), *b* – липидная мембрана ($\sim 65 \text{ \AA}$), *c* – гидрофобная область бислоя ($\sim 35 \text{ \AA}$) и *d* – полярные головки липидов ($\sim 15 \text{ \AA}$).

Расчеты молекулярной динамики проводились с использованием пакета программ GROMACS [3-5]. Для корректности расчетов МД важным является выбор способа численного решения уравнений движения и подбор оптимального шага интегрирования. Для решения уравнений движения был выбран "стохастически-динамический" (*sd*) способ, как наиболее физически адекватный [5]. Оптимальный шаг интегрирования был

определен, как наибольший из возможных, для которых результат расчета устойчиво воспроизводился вне зависимости от начальных условий. Анализ показал, что при шаге интегрирования $\tau \leq 0.25$ фс средняя энергия деформации углов и связей модельных молекул практически не зависит от начальных условий. Шаг интегрирования был выбран равным 0.25 фс, поскольку выбор меньшего шага влечет за собой излишние затраты вычислительных ресурсов. Контроль адекватности модели производился на основании следующих критериев: распределение энергии системы по различным степеням свободы должно быть равномерным; средняя энергия, приходящаяся на одну степень свободы системы, должна составлять $\frac{1}{2}kT$. Нам удалось достичь удовлетворительного соответствия модельной системы этим критериям (рис.2).

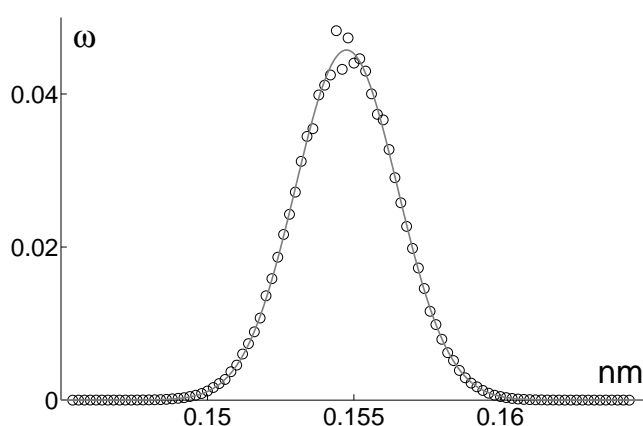


Рис 2. Распределение длин всех углеводородных C–C связей модельной молекулярной системы. Интегральное среднее значение потенциальной энергии деформации углов, рассчитанное для модели, составляет 0.46 кДж/моль. Это значение хорошо согласуется с энергией даваемой статистической термодинамикой, $\frac{1}{2}RT = 0.42$ кДж/моль. Сглаженная кривая (–) представляет Гауссову функцию, полученную при регрессионном анализе экспериментальных данных (o).

Для уравнивания модели был проведен 10 нс релаксационный расчет молекулярной динамики, финальные координаты атомов которого использовались в качестве исходных для дальнейших расчетов. В результате релаксации мембрана приобрела устойчивую конформацию характерную для реальных мембран. В частности, величина параметра упорядоченности, характеристики отражающей локальную подвижность отдельных $-CH_2-$ групп гидрофобных участков молекул липидов, совпадает с результатами полученными в реальном эксперименте рис. 3 [1, 2]. Также в хорошем соответствии с прямым экспериментом находится распределение плотности вдоль нормали к плоскости мембраны рис. 3 [1, 2]. Для расчета профилей плотности и параметра упорядоченности использовались утилиты пакета GROMACS. Параметры воды также достигли устойчивых, реалистичных значений: плотность воды составила ~ 1 г/см³, коэффициент самодиффузии воды $\sim 10^{-5}$ см²/с. Более того, над поверхностью мембраны образовался слой малоподвижной воды (слой Штерна), имеющий толщину порядка нескольких Å и коэффициент самодиффузии на два порядка ниже, чем в объемной фазе ($\sim 10^{-7}$ см²/с).

Такие параметры находятся в полном согласии с экспериментом [10] и свидетельствуют об адекватности модели.

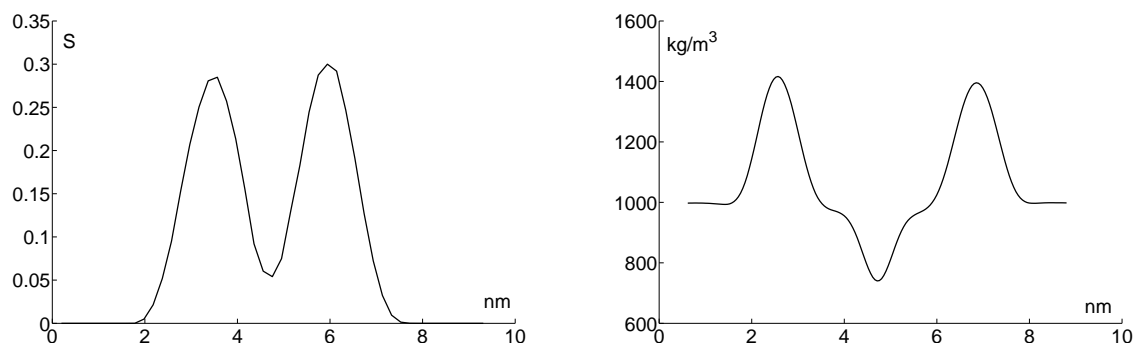


Рис 3. Параметр упорядоченности для $-CH_2-$ групп остатков жирных кислот (слева) и транс-мембранный профиль плотности молекулярной системы (справа).

Оценка латеральной подвижности липидов. В случае липидного бислоя, интерес представляет диффузия молекул липида в плоскости мембраны [11]. Малые перемещения липидов вдоль нормали к бислою носят колебательный характер и не могут рассматриваться как диффузионные [12]. Экспериментальное исследование диффузионных процессов в липидных мембранах связано с усреднением по большим ансамблям частиц и временам порядка секунд [1]. В рамках же метода МД доступны времена порядка 10 нс, а количество наблюдаемых частиц измеряется сотнями или тысячами. Поэтому для получения из МД расчетов оценок параметров подвижности необходимы специальные методы, дающие устойчивые реалистичные значения на малых временах и при усреднении по небольшим ансамблям частиц.

Допустим имеется группа молекул липида. В процессе диффузии расстояние между молекулами будет расти: $\langle R^2 \rangle = 4Dt$, где R – смещение ЦМ молекулы, а t – время. Множитель 4 связан с двухмерностью диффузионного пространства. Рассмотрим дисперсию распределения группы молекул липида по расстоянию до общего центра масс, $\sigma^2 = \frac{1}{n} \sum R_i^2$, где n – число частиц, а R_i – расстояние ЦМ липида до общего центра масс. В данном случае двухмерность пространства учтена при усреднении по ансамблю частиц, диффундирующих в плоскости, следовательно, дисперсия $\sigma = \sqrt{Dt}$, а тангенс угла наклона на графике (σ^2, t) является коэффициентом диффузии D . Так как исследуемая модельная система содержит только 48 молекул липида, то для эффективного увеличения исследуемого ансамбля частиц, липиды были случайным образом сгруппированы в несколько (~ 100) групп. После усреднения по всем группам (σ^2, t) хорошо аппроксимируется прямой во всех рассматриваемых диапазонах времен (рис. 4), что позволяет оценить D . Основное достоинство предлагаемого подхода заключается в том, что случайные тепловые движения отдельных молекул липидов несогласованны и, вследствие симметрии направлений в плоскости бислоя, при усреднении по группе молекул сокращаются. Это позволяет существенно сократить время измерений и необходимый для

усреднения ансамбль.

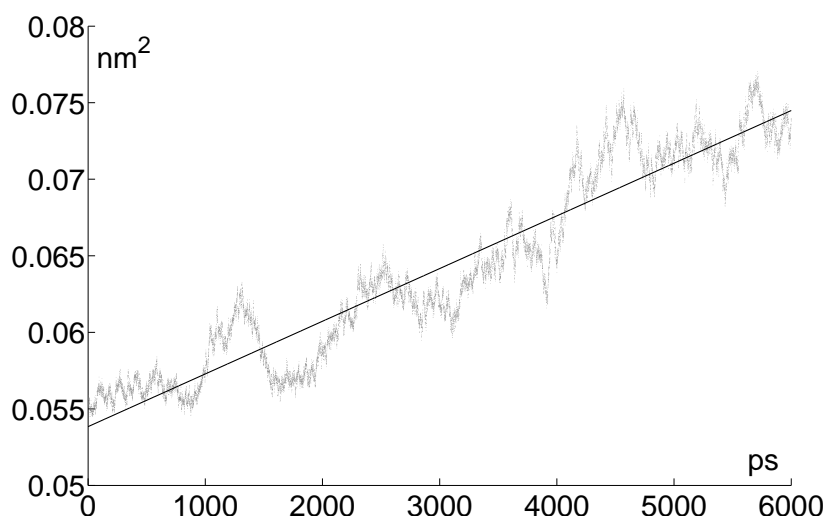


Рис 4. Зависимость дисперсии центров масс группы молекул ДСФХ от времени. Каждая точка получена усреднением по $\sim 10^2$ измерений. Тангенс угла наклона прямой соответствует коэффициенту латеральной диффузии липидов $D = 1.46 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$.

Оценка вращательной подвижности липидов. Можно считать, что вращение молекул липида происходит только вокруг длинной оси молекулы, так как вращение вокруг двух других осей сопряжено с нарушением бислоидной структуры и крайне затруднено [1, 12]. Мы вели наблюдение за вращением вектора, связывающего ЦМ ацильных хвостов молекулы липида. Для описания интенсивности вращательного движения в эксперименте используют время вращательной корреляции (τ), отражающее характерное время необходимое молекуле или ее части для поворота на угол $\frac{\pi}{2}$ [1, 2]. Мы разработали метод оценки этого параметра, основанный на изменении со временем характеристик распределения молекул липидов по углам поворота.

Рассмотрим распределение молекул липида по углу поворота относительно начального положения. В начальный момент времени углы поворота молекул равны нулю, распределение представляет δ -функцию. С течением времени молекулы поворачиваются и распределение молекул по углу поворота уширяется. По мере размывания распределения, границы доверительного интервала для среднего значения угла будут расти (рис. 5). Момент времени, к которому границы доверительного интервала ($\alpha = 50\%$) для среднего угла поворота достигают $\pm \frac{\pi}{4}$, мы использовали в качестве оценки τ , так как это время за которое, в среднем, одна половина молекул повернется относительно другой половины на угол $\frac{\pi}{2}$. Для увеличения выборки и получения более репрезентативных результатов был использованы различные группы молекул липидов (~ 100) с различными стартовыми точками.

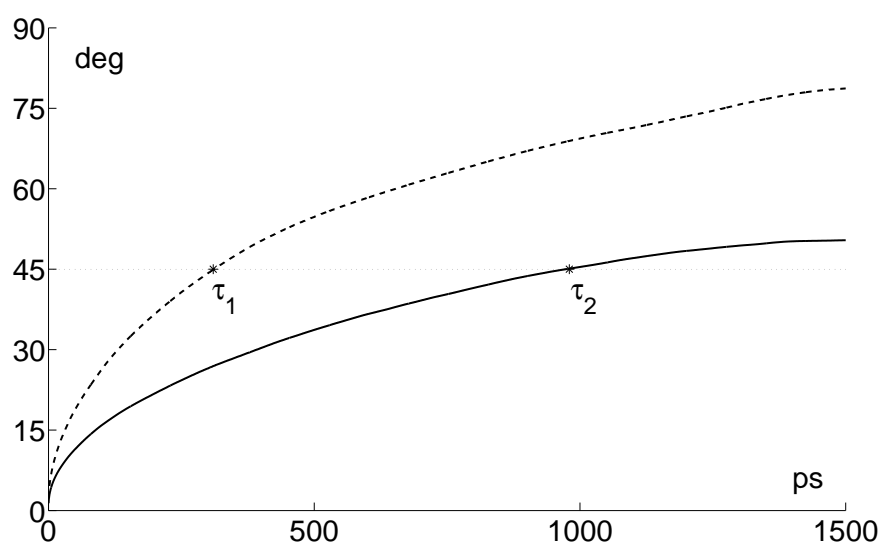


Рис 5. Временная зависимость положения границ симметричного доверительного интервала ($\alpha = 50\%$) для математического ожидания распределения молекул ДСФХ по углу поворота относительно начального положения. Графики построены для полярных головок (---) и ацильных хвостов молекул ДСФХ (—). Горизонтальная прямая (···) соответствует пороговому значению $\frac{\pi}{4}$, точки пересечения графиков и прямой соответствуют временам вращательной корреляции, составляющим, $\tau_1 = 311$ пс и $\tau_2 = 974$ пс, для полярных головок и ацильных хвостов, соответственно.

Модель жидкокристаллического состояния. Из эксперимента известно, что для ДСФХ мембраны в жидкокристаллическом (ЖК) состоянии характерны следующие геометрические параметры. Средняя площадь, приходящаяся на молекулу липида составляет $\sim 52 \text{ \AA}^2$ [1, 2]. Толщина гидрофобной части бислоя $\sim 32 \text{ \AA}$. Также известно что ацильные хвосты молекул липида не упорядочены [1, 13]. Коэффициент латеральной диффузии липидов в ЖК фазе составляет $\sim 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$, а τ имеет среднюю величину 100–1000 пс [1, 2].

Для нашей модели жидкокристаллического состояния характерны следующие равновесные параметры. Средняя площадь приходящаяся на молекулу ДСФХ составила 48.7 \AA^2 . Среднее по нормали расстояние между атомами фосфора в противоположных монослоях составило 35.3 \AA . Ацильные хвосты молекул липидов разупорядочены. Коэффициент латеральной диффузии равняется $(1.46 \pm 0.22) 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$. Время вращательной корреляции составило 974 ± 238 пс. Равновесные параметры модельной системы удовлетворительно согласуются с данными реального эксперимента (табл.1). Это свидетельствует о том, что модель достаточно корректна для исследований процессов, протекающих в липидных мембранах. В частности, полученная модель может быть использована для исследований подвижности молекул липидов, а также их взаимодействия друг с другом.

Таблица 1. Геометрические и динамические характеристики ДСФХ мембраны в гелевом и жидкокристаллическом состоянии. Представлены величины рассчитанные для модели и экспериментальные данные. S – средняя площадь, приходящаяся на липидную молекулу; L – толщина гидрофобной области бислоя; α – угол наклона ацильных цепей в гелевом состоянии; D – коэффициент латеральной диффузии; τ – время вращательной корреляции.

состояние	жидкокристаллическое		гелевое	
	модель	эксперимент	модель	эксперимент
S (\AA^2)	48.7	52	34.1	~ 40
L (\AA)	35.3	32	53	~ 50
α (град)	–	–	10	12
D ($\text{см}^2/\text{с}$)	$1.46 \cdot 10^{-8}$	$\sim 10^{-8}$	$\sim 10^{-9}$	$\sim 10^{-12}$
τ (с)	$\sim 10^{-10}$	$\sim 10^{-10}$	$\sim 10^{-9}$	$\sim 10^{-6}$

Модель гелевого состояния. Экспериментально показано, что для фосфатидилхолинов в гелевом состоянии средняя площадь, приходящаяся на липид составляет $\sim 40 - 45 \text{\AA}^2$ [1, 14, 15]. Толщина гидрофобной части ДСФХ бислоя в гелевой фазе в литературе не обнаружена, но ее можно оценить, опираясь на параметры других фосфатидилхолинов. Толщина гидрофобной части бислоя из димеристоилфосфатидилхолина в гелевой фазе составляет $\sim 30 \text{\AA}$ [14]. Для дипальмитоилфосфатидилхолина этот параметр $\sim 40 \text{\AA}$ [15]. Что позволяет оценить толщину гидрофобной области ДСФХ как $\sim 50 \text{\AA}$ [13, 16]. Так же известно, что гидрофобные участки молекул фосфатидилхолинов в гелевой фазе наклонены относительно нормали к бислою на угол $\sim 12^\circ$ [1, 14, 15].

Для создания модели гелевой фазы необходимо расположить остатки жирных кислот строго определенным способом. Причем экспериментально известны лишь общие принципы расположения ДСФХ в гелевой фазе [14, 15], в то время как точные параметры упаковки липидов неизвестны. В таком положении физически наиболее разумным способом создания модели гелевого состояния было бы аккуратно заморозить модельную ЖК мембрану. Но в рамках метода МД это невозможно из-за большой (\sim мс) длительности фазового перехода [1, 2]. Из литературы известно, что при увеличении давления существенно повышаются температура плавления липидных мембран [1, 17], соответственно увеличивается и скорость протекания фазового перехода, чем мы и воспользовались. Для ускорения перехода в гелевое состояние, давление в модельной системе было ступенчато увеличено до 10^5 бар, с промежуточной релаксацией системы при повышенном давлении. Затем температура была поднята до 600К и проведен 10 нс расчет, при тангенциальном давлении 10^5 бар, нормальное к бислою давление при этом равнялось атмосферному. По окончании расчета, температура была уменьшена до 300К, а тангенциальное давление ступенчато приведено в норму.

После нормализации давления, модельная липидная мембрана приобрела следующие геометрические параметры: 1. Ацильные хвосты вытянуты и плотно упакованы. 2. Средняя площадь приходящаяся на молекулу липида 34.1\AA^2 . 3. Среднее по нормали к бислою расстояние между атомами фосфора в разных монослоях составило 53\AA . 4. На-

клон акцильных цепей относительно нормали к бислою составил $\sim 10^\circ$. Такие значения характерны для реальных ДСФХ мембран в гелевом состоянии (табл.1).

Коэффициент латеральной диффузии, рассчитанный для модели гелевого состояния, составил $D \sim 10^{-9}$ см²/с, а время вращательной корреляции $\tau \sim 10^{-9}$ с. Полученные оценки параметров подвижности существенно больше, чем следует из эксперимента, что свидетельствует об отличии модели от равновесного гелевого состояния ДСФХ бислоя (табл.1). В ходе расчетов МД мы обнаружили, что при температуре 300К, которая ниже температуры фазового перехода в реальных ДСФХ мембранах (53°C [18]), все параметры модельной системы стремятся к значениям характерным для ЖК фазы. Это может означать, что в ходе подготовки модели гелевого состояния, молекулярная система не претерпела фазовый переход полностью и в структуре бислоя сохранились дефекты. Наличие дефектов может быть причиной неустойчивости модели, так как она очень мала (48 молекул ДСФХ), то есть по сути является лишь зародышем гелевой фазы и чувствительна к любым малым тепловым флуктуациям. Другая причина неустойчивости модели гелевого состояния заключается в особенностях метода МД. В процессе численного интегрирования уравнений движения возникают ошибки. Накапливаясь, эти ошибки приводят к постепенному разогреву модельной системы. Для компенсации этого негативного эффекта используется алгоритм отвода излишков энергии (термостат) [3, 4]. Возможно, переход модельной системы из гелеподобного в ЖК состояние связан с тем, что лишняя энергия не только отводится термостатом, но и расходуется на плавление мембраны.

Заключение. Сравнение оценок параметров модельной бислоевой мембраны с экспериментально измеренными величинами (табл.1) показывает, что модельная система в ЖК состоянии хорошо описывает реальную ДСФХ мембрану. В созданной модели хорошо воспроизводится геометрическая структура бислоевой мембраны и упаковка липидов. Кроме того, в модели получены реалистичные оценки коэффициента латеральной диффузии и времен вращательной релаксации молекул ДСФХ.

Была создана модель гелевого состояния бислоя, по своим геометрическим характеристикам соответствующая реальной мембране. Однако, подвижность молекул липида в модели гелевого состояния оказалась существенно выше чем в реальных мембранах. Кроме того с течением времени геометрические параметры модели гелевого состояния со временем релаксировали к значениям характерным для ЖК фазы. Мы предполагаем, что наблюдающаяся неустойчивость модели связана с недостаточными размерами систем доступных для МД расчета. Размеры созданной нами модели соответствуют зародышу гелевой фазы, следовательно, она чувствительна к любым случайным флуктуациям. Кроме того, неустойчивость модели гелевого состояния связана с численными ошибками дискретной процедуры интегрирования уравнений движения и функционированием процедуры термостатирования. Мы предполагаем, что накапливающаяся вследствие ошибок интегрирования энергия не полностью отбирается термостатом, а частично расходуется на плавление неустойчивого зародыша гелевой фазы.

Хорошее соответствие между моделью ЖК фазы и реальными мембранами позволяет использовать эту модель для исследования липидных мембран. Создан инструмент,

позволяющий изучать динамическое поведение отдельных молекул ДСФХ с пикосекундным временным разрешением, что недоступно прямому эксперименту. Кроме того, для конструирования гелевой фазы был создан физически адекватный метод, позволивший наблюдать перестройку геометрической структуры бислойной мембраны из ЖК в гелевое состояние, что позволит в дальнейшем моделировать фазовые переходы в липидных мембранах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Генис П.Б.* Биомембраны. Москва, изд-во Мир, 1997.
2. *Ole G. Mouritsen.* LIFE – AS A MATTER OF FAT. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany. 2005.
3. *Berendsen H.J.C., Spoel D., van Drunen R.* // *Comp. Phys. Comm.* 1995. V. 91. P. 43-56.
4. *Lindahl E., Hess B., van der Spoel D.* // *J. Mol. Mod.* 2001. V. 7. P. 306-317.
5. *Spoel D., van Buuren A.R., Berendsen H.J.C. et all.* Gromacs User Manual. <ftp://ftp.gromacs.org/pub/manual/manual-3.3.pdf>, version 3.3.
6. *Granovsky A.A.* PC GAMESS version 7.1. <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>
7. *Nemukhin A.V., Grigorenko B.L., Granovsky A.A.* // *Moscow University Chemistry Bulletin.* 2004. V. 45(2). P. 75.
8. *Smondyrev A.M., Berkowitz M.L.* // *Biophys. J.* 2000. V. 78. P. 1672-1680.
9. *Pitman M.C., Grossfield A., Suits F., Feller S.E.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 4576-4577.
10. *Stern. O.* // *Z. Elektrochem.* 1924. V. 30. P. 508-516.
11. *Singer S.J., Nicolson G.L.* // *Science (Wash. DC).* 1978. V. 175. P. 720-731.
12. *Намуом В.А.* // 1986. Биофизика, Т. XXXI, вып. 3, С. 449-452.
13. *Ipsen J.H., Mouritsen O.G., Bloom M.* // *Biophys. J.* 1990. V. 57. P. 405-412.
14. *Tristram-Nagle S., Liu Y., Legleiter J., Nagle J.F.* // *Biophys. J.* 2002. V. 83. P. 3324-3335.
15. *Wiener M.C., Suter R.M., Nagle J.F.* // *Biophys. J.* 1989. V. 55. P. 315-325.
16. *Lewis B.A., Engelman D.M.* // *J. Mol. Biol.* 1983. V. 166. P. 211-217.
17. *Chong P.L.G., Fortes P.A.G.* // *Biochem.* 1983. V. 22. P. 5544-5550.
18. *Ali S., Minchey S., Janoff A., Mayhew E.* // *Biophys. J.* 2000. V. 78. P. 246-256.

MOLECULAR MODEL OF LIPID BILAYER. GEL AND LIQUID-CRYSTALLINE PHASES

Dmitry V. Zlenko, Pavel M. Krasilnikov

A model of gel and liquid-crystalline lipid bilayer in water has been constructed. The model of liquid-crystalline bilayer reproduces correctly lipid molecules mobility and packing. The model also presents proper bilayer geometry in equilibrium state. The model of gel phase reproduces real bilayer lipid packing and geometry in gel phase. New methods of lipid molecules mobility estimation in Molecular Dynamic studies are also presented.