



Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես Биологический Журнал Армении Biological Journal of Armenia

• Флрд шр шр шц ши и ы и шц ши нл д ц шб и в р. • Экспериментальные и теоретические статьи •

• Experimental and Theoretical articles •

Биолог. журн. Армении, 1 (62), 2010

# МОДЕЛИРОВАНИЕ И ДИНАМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФРАГМЕНТА УПРОЩЕННОЙ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТА ПРИ ПОМОЩИ КОМПЬЮТЕРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

## П.К. АКОПЯН, Г.А. ГАРАБЕКЯН, А.Г. ПОГОСЯН, А.А. ШАГИНЯН

Международный научно-образовательный центр НАН РА

Исследовали динамическую структуру фрагмента мембраны эритроцита человека с помощью компьютерного эксперимента, а также такие важные свойства мембраны, как латеральная диффузия молекул фосфолипидов и белка гликофорина А в мембране, распределение различных фосфолипидов и динамические изменения конформации углеводородных цепочек фосфолипидных молекул.

#### Мембрана эритроцита человека - латеральная диффузия фосфолипидная мембрана

Համակարգչային փորձի օգնությամբ հետազոտվել է մարդու էրիթրոցիտի թաղանթի հատվածի դինամիկ կառուցվածքը և որոշ կարևոր հատկություն-ներ, այդ թվում ֆոսֆոլիպիդային մոլեկուլների լաթերալ դիֆուզիայի օրինաչափությունները, գլիկոֆորին Ա թաղանթային սպիտակուցի վարքը ֆոսֆոլիպիդների բաշխվածությունը, ինչպես նաև ֆոսֆոլիպիդային մոլեկուլների ածխաջրածնային շղթաների դինամիկ վարքը թաղանթի ներսում և այլն։

> Մարդու էրիթրոցիտի թաղանթ - լաթերալ դիֆուզիա ֆոսֆոլիպիդային թաղանթ

The dynamic structure of a fragment of human erythrocyte membrane was investigated through the computer experiment. Some important properties including mechanisms of the lateral diffusion of phospholipids molecules, behaviour of Glycophorin A protein molecules, distribution of different phospholipids and dynamic behavior of hydrocarbon chains of phospholipid molecules within the membrane were examined.

> Human erythrocyte membrane - lateral diffusion phospholipid bilayer

В последнее время применение компьютерного эксперимента в научноисследовательских работах приобретает все большее и большее распространение. Его возникновение, в первую очередь, связано с высоким развитием информационных технологий: созданием высокопроизводительных вычислительных комплексов и новейших инструментов вычисления, а также с резким ростом расходов при физических экспериментах. Компьютерный эксперимент представляет собой симбиоз физического эксперимента и теории. С одной стороны, цифровая модель системы строится по данным физического эксперимента, с другой – само исследование проводится при помощи воздействия силовых полей, описываемых формулами, на систему. МОДЕЛИРОВАНИЕ И ДИНАМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФРАГМЕНТА УПРОЩЕННОЙ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТА...

Учеными показано, что методы и возможности информационных технологий можно эффективно использовать и для исследования молекулярной структуры и свойств сложных многокомпонентных биологических и химических систем в динамике [1-3]. Возникают совершенно новые перспективные области применения вычислительных методов, которые позволяют рассматривать более комплексные и близкие к реальности системы модели. Уже созданы и развиваются специализированные алгоритмы и инструменты расчета, наиболее распространенным из которых является метод "молекулярной динамики" [4].

В настоящей работе методом компьютерного эксперимента исследована структура мембраны эритроцита человека и ламеллярной жидкокристаллической фазы некоторых поверхностно-активных веществ (ПАВ).

#### МЕТОДЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ И КОМПЬЮТЕРНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ

Компьютерные эксперименты были проведены на высокопроизводитель-ном Армкластере НАН РА. На данный момент Армкластер является самой мощной высокопроизводительной системой на Кавказе, с пиковой производи-тельностью 783.36 Гигафлоп и 2Гб оперативной памяти на каждом узле. Узлы объединены в сеть при помощи высокоскоростной сети Myrinet (2Гбит/с). Кластер работает под ОС Linux RedHat 9.0 с поддержкой SMP. Для визуализации молеку-лярной динамики использован пакет VMD: Visual Molecular Dynamics.

	Ниже представлены параметры симулирования.					
•	Использованные ноды /процессоры :	25/50				
•	Тип процессора:	Intel Xeon 3.06GHz				
•	Тип связи:	Myrinet				
•	Программное обеспечение:	Gromacs, NAMD 2.5, MDesigner				
•	Силовые поля:	CHARMM all27				
•	Температура и давление в эксперименте	320K и 1атм				
	(Langevin and Nose-Hoover Langevin piston methods)					
•	Модель воды	TIP3				
•	Биологическое время симулирования:	60-100 нсек.				
•	Химическое время симулирования:	20-230 нсек.				
•	Время, требуемое для экспериментов на одном компьютере: 10 лет					
•	Время экспериментов на Армкластере:	3 месяца.				
•	Временной шаг интегрирования:	2 фемто сек.				

В качестве основного метода моделирования был использован метод «молекулярной динамики» (МД), который позволяет моделировать детальную микроскопическую картину внутренних движений молекул (или макромолекул) и успешно используется в теоретических исследованиях структуры и динамики биологических макромолекул, жидкостей, газов и других сложных молекулярных систем. Методом МД рассчитываются классические (ньютоновские) траектории движения атомов молекулы в силовом поле эмпирического атом-атомного потенциала, т.е. моделируется детальная микроскопическая картина внутреннего теплового движения макромолекулы в субнаносекундных интервалах времени. Основу метода составляет численное решение классических уравнений Ньютона для системы взаимодействующих частиц:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{F}_i(r), \ i = 1, 2, \dots, n,$$
(1)

где  $r_i$  - радиус-вектор *i*-го атома,  $m_i$  - его масса,  $F_i$  - суммарная сила, действующая на *i*-й атом со стороны остальных частиц:

П.К. АКОПЯН, Г.А. ГАРАБЕКЯН и др

$$F_{i}(\mathbf{r}) = -\frac{\partial U(\mathbf{r})}{\partial \mathbf{r}_{i}}.$$
(2)

Здесь  $r = \{r_1, r_2, ..., r_n\}$ , а U(r) - потенциальная энергия, зависящая от взаимного расположения всех атомов; n - число атомов.

Задав координаты и скорости всех атомов в начальный момент времени, численно решают уравнения движения, вычисляя на каждом шагу все силы, новые координаты и скорости частиц. Температура определяется как средняя кинетическая энергия, приходящаяся на одну степень свободы системы:

$$T(t) = \frac{1}{3Nk_{B}} \sum_{i=1}^{n} m_{i} V_{i}^{2}, \qquad (3)$$

$$\boldsymbol{\mathcal{V}}_{i} = \frac{d\boldsymbol{r}_{i}}{dt} \cdot \tag{4}$$

Здесь N - полное число степеней свободы молекулы,  $k_{R}$  - постоянная Больц-

мана. В случае изолированной системы N=3n-6, поскольку сохраняется ее полный импульс и момент импульса. Кроме того, в этом случае сохраняется полная энергия системы, а температура получается усреднением ее мгновенных значений T(t) по некоторому интервалу времени.

Для моделирования методом МД нами использованы следующие файлы: файл координат атомов системы и файл топологий молекул модели, в котором содержатся параметры всех ковалентных связей, валентных и торсионных углов и т.д. атомов системы. За основу были взяты типовые топологии фосфолипидных молекул с полярными головками фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина, содержащиеся в стандартном файле топологии top\_all27\_prot\_lipid. Эти данные имеются в последней версии силовых полей CHARMM27 [5], а для манипуляций с атомами использовалась программа VMD. Был написан скрипт на макроязыке TCL, который в автоматическом режиме создает стартовый фосфолипидный бислой, или мицеллу ПАВ, случайным образом вращая молекулы фосфолипидов или ПАВ вокруг своих осей, помещая каждую молекулу в прямоугольные ячейки, после чего эти ячейки случайным образом распределяются в массиве размером 64х2 в случае мембраны и 256х2 в случае мицелл. Для симуляции мембран эритроцита был проведен сравнительный анализ [6] известных пакетов Gromacs и NAMD, на основании которого было выбрано программное обеспечение для наших исследований. Для проведения компьютерного эксперимента на биологических мембранах был разработан также специальный пакет программ Mdesigner [7]. При моделировании использованы 5 типов фосфолипидов, имеющихся в мембране эритроцита человека [8].

В фосфолипидную мембрану ввели также важный функциональный белок, характерный для эритроцита: гликофорин А.

В качестве ПАВ использованы додецилсульфат натрия-C12H25SO4Na и пентадецилсульфонат натрия – C15H31SO3Na, промышленной марки E-30 и K-30.

1-палмитоил-2-олеоил-сн-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (ПОФЭ)-10%;





#### РЕЗУЛЬТАТЫ КОМПЬЮТЕРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

<u>Мембрана эритроцита</u>. На рис.1 представлена модель равновесного фосфолипидного бислоя мембраны эритроцита человека в присутствии воды, полученная компьютерным экспериментом при помощи минимизации свободной энергии системы. Анализ данных, представленных на рис.16, показывает, что в мембране разные типы фосфолипидов не смешиваются.

Таким образом, из данных компьютерного эксперимента можно сделать предположение, что в мембране эритроцита должны существовать домены отдельных фосфолипидов.

Если это предположение верно, то оно должно сказаться на процесс диффузии фосфолипидных молекул в мембране. С этой целью была исследована латеральная диффузия молекул всех типов фосфолипидов в модельной мембране эритроцита.

Для определения коэффициента латеральной диффузии (проекция диффузии молекул фосфолипидов в плоскости х-у) воспользовались формулой, описывающей зависимость среднеквадратичного отклонения центра тяжести отдельных типов фосфолипидов (MSD) от времени: П.К. АКОПЯН, Г.А. ГАРАБЕКЯН и др.

$$MSD = \sum_{all} < \left| \vec{r}(t) - \vec{r}(0) \right|^2 >,$$

где  $\vec{r}(0)$  и  $\vec{r}(t)$  радиус – векторы центра тяжести молекул в начале процесса диффузии и в момент *t*.

При этом зависимости MSD для отдельных фосфолипидов от времени симуляции (*t*) описываются формулой:

$$D_{lat} = MSD / 4 \cdot t$$
.



Рис. 1. Равновесная модель фосфолипидного бислоя (а) при соотношении фосфолипидов: 12% ПОФХ / 13% СОФХ / 12% САФЭ / 10% ПОФЭ/25% ХОЛ. Распределение фосфолипидов в мембране (б). Проекция на плоскость х-у.

На рис. 2 представлены зависимости MSD от времени симуляции для отдельных фосфолипидов при латеральной диффузии их молекул в мембране, полученные компьютерным экспериментом.



**Рис. 2.** Зависимость MSD от времени симуляции для фосфолипидов: СОФХ, ПОФХ, САФЭ и ПАФЭ в мембране эритроцита.

Значения коэффициентов латеральной диффузии отдельных фосфолипидов в мембране эритроцита представлены в табл.1.

В настоящее время методы физического эксперимента позволяют измерять коэффициенты латеральной диффузии только для искусственных бимолекулярных слоев, состоящих из одного типа фосфолипида [9,10].

Сравнивая значения коэффициентов латеральной диффузии для бислоев отдельных фосфолипидов и мембраны эритроцита, содержащей все эти фосфолипиды, обнаруживаем совпадение. Такое совпадение коэффициентов латеральной диффузии может быть только в том случае, если отдельные фосфолипиды в мембране имеют свои собственные ареалы существования, как это представлено на рис.16.

Таблица 1. Коэффициенты латеральной диффузии для разных фосфолипидов в мембране.

Фосфолипиды	СОФХ	ПОФХ	САФЭ	ПОФЭ
Коэффициент	$4,2 \times 10^{-8}$	$3,7 \times 10^{-8}$	$2,9 \times 10^{-8}$	2,6×10 <sup>-8</sup>
диффузии, см <sup>2</sup> /с				

В динамике при симулировании до 100 нсек видно, что все компоненты фосфолипидной мембраны находятся в состоянии непрерывного теплового движения. При этом интенсивным конформационным изменениям подвергаются углеводородные цепочки молекул фосфолипидов внутри мембраны. Для изучения усредненной картины конформационных изменений углеводородных цепочек молекул отдельных фосфолипидов в мембране методом компьютерного эксперимента было исследовано изменение параметра ориентационного порядка углеводородных цепочек молекул:

$$S_{mol} = \frac{3}{4} < \cos^2 \theta_i > -\frac{1}{4} / ,$$

где  $\theta_i$  - угол между осью молекулы и нормали к поверхности мембраны. Скобки обозначают ансамбль и усреднение во времени. Из приведенной формулы видно, что если углеводородная цепочка или ее фрагмент расположены параллельно к нормали поверхности бислоя, то  $S_{mol} = 0,5$ , а если перпендикулярно, то  $S_{mol} = 0,25$ .

На рис.3 в качестве примера показаны изменения степени ориентации углеводородных цепочек молекул ПОФХ и ПОФЭ по мере углубления в гидрофобный объем бислоя.



**Рис. 3.** Зависимость параметра ориентационного порядка углеводородных цепочек молекул фосфатидилхолина - ПОФХ (а) и фосфатидилэтаноламина – ПОФЭ (б) от глубины погружения в мембрану.

Как видно из рисунков, участки углеводородных цепочек молекул фосфолипидов, расположенных ближе к поверхности бислоя (к глицерольной группе), ориентируются приблизительно перпендикулярно к нормали. Это обусловлено, вероятно, тем, что глицерольная группа расположена перпендикулярно к нормали поверхности бислоя. По мере удаления от глицерольной группы вглубь бислоя, углеводородные цепочки становятся конформационно более свободными и начинают ориентироваться преимущественно параллельно к нормали поверхности бислоя. При дальнейшем удалении от полярной группы молекул фосфолипида из-за увеличения степени свободы движения углеводородных цепочек их ориентационный порядок начинает уменьшаться, стремясь к полной дезориентации.

Ориентационный порядок экспериментально был исследован для фосфолипидных бислоев, состоящих из одного типа фосфолипида [11].

Как видно из рис. 4, данные, полученные методом ЯМР спектроскопии и компьютерным экспериментом для дипальмитоил-фосфатидилхолина, хорошо согласуются.



**Рис. 4.** Ориентационные параметры порядка углеводородных цепочек молекул дипальмитоилфосфатидилхолина, полученные физическим экспериментом и моделированием.

Таким образом, в тех случаях, когда можно поставить физический эксперимент, результаты физического и компьютерного экспериментов достаточно хорошо совпадают.

Известно, что одним из наиболее изученных из мембранных белков эритроцита является гликофорин А, представляющий собой гликопротеид, пронизывающий фосфолипидные слои мембраны и выступающий наружу. Гликофорин образует устойчивый димер не только в природных системах, но и в искусственных липидных средах, таких как мицеллы додецилфосфатидилхолина. Для этого белка найдена пространственная структура димера методом ЯМР-спектроскопии [12, 13].

Модель фрагмента мембраны эритроцита нами была построена при помощи внедрения мембранного белка эритроцита гликофорина А в равновесный гидратированный фосфолипидный бислой. На рис.5а представлена равновесная модель фрагмента мембраны эритроцита, содержащая гликофорин А.



Рис. 5 Равновесная модель фрагмента мембраны эритроцита (а). Угол между α, β спиралями молекулы гликофорина A (б).

Рассмотрим динамику поведения  $\alpha$  и  $\beta$  – субъединиц гликофорина A в мембране. На рис. 56 представлена зависимость угла наклона между  $\alpha$  и  $\beta$  – субъединицами белка внутри мембраны.

Имеются работы, где методами ЯМР-спектроскопии и динамического моделирования изучено влияние структуры молекул фосфолипида на конформацию гликофорина А для искусственной мембраны, состоящей из одного типа фосфолипида [13]. Исследована зависимость конформации гликофорина от длины и степени насыщенности углеводородных цепей фосфолипидов, окружающих гликофорин. С помощью МД и ЯМР установлено, что с увеличением количества CH<sub>2</sub> групп и двойных связей углеводородных цепей фосфолипидов увеличивается угол между спиралями димера гликофорина. Показано, что при увеличении числа CH<sub>2</sub> групп в углеводородных цепочках молекул фосфолипида с 14 до 18 угол между спиралями в среднем достигает величины  $11^0$ . В нашем случае, где вместо гомогенной фосфолипидной мембраны исследуется гетерогенная мембрана с молекулами фосфолипидов, имеющих углеводородные цепочки с числом CH<sub>2</sub> групп от 16 до 20, в среднем угол имеет значение порядка  $30^0$ . По всей вероятности, увеличение угла связано с доминированием гидрофобности в окружении белка.

Большой интерес представляет взаимодействие холестерина с гликофорином А и влиянием белка на динамику поведения молекул воды в мембране.

На рис. 6 представлен белок гликофорин А в окружении молекул холестерина в мембране эритроцита. Как видно из рис., в мембране эритроцита молекулы холестерина взаимодействуют с молекулой гликофорина А и окружают ее.

Важной проблемой является проникновение молекул воды в мембрану. Компьютерный эксперимент показывает отсутствие молекул воды в гидрофобной части мембраны в отсутствие белка и проникновение в мембрану в присутствии гликофорина А.



**Рис. 6**. Белок в окружении холестерина. Молекулы остальных фосфолипидов и воды на рисунке не показаны

На рис. 7 показано стартовое состояние системы вода-гликофорин А в начале компьютерного эксперимента и после 100 нсек симулирования. Молекулы фосфолипидов на рисунке не показаны.

Как видно из рисунка, в непосредственной близости молекулы белка имеет место проникновение молекул воды в мембрану, что, вероятно, обусловлено асимметричной структурой белка.

Таким образом, показана возможность применения компьютерного эксперимента для исследования сложных биологических мембран.



**Рис. 7**. Стартовое состояние мембраны эритроцита (а) и после 100 нсек. симуляции. Молекулы фосфолипида на рисунке не показаны.

### ЛИТЕРАТУРА

- 1. *Tieleman, D.P. and H.J.C. Berendsen.* Molecular dynamics simulations of a fully hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with different macroscopic boundary conditions and parameters. J. Chem. Phys. *105*, 4871–4880, 1996.
- 2. K. Tu, D.J. Tobias & M.L. Klein. Constant pressure and temperature molecular dynamics simulation of a fully hydrated liquid crystal phase dipalmitoylphospha-tidylcholine bilayer. Biophys. J., 69, 2558-2562, 1995.
- 3. S.W. Chiu, M. Clark, V. Balaji, S. Subramaniam, L.H. Scott & E. Jakobsson. Incorporation of surface tension into molecular dynamics simulation of an interface: a fluid phase lipid bilayer membrane. Biophys. J. 69, 1230-1245, 1995.
- 4. *E. Lindahl, B. Hess & D. van der Spoel.* Gromacs 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. J. Mol. Mod. 7, 306-317 2001.
- B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan and M. Karplus, CHARMM: A Program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. J. Comput. Chem., 4, 187-217, 1983.
- 6. A.H.Pogosyan, G.A.Yegiazaryan, H.H.Gharabekyan, A.A.Shahinyan The GROMACS and NAMD software packages comparison. Commun. Comput. Phys, 1, 4, 736-743, 2006.
- 7. A.A.Shahinyan, A.H.Pogosyan, G.A.Yegiazaryan, H.H.Gharabekyan A Software tool for constraction of biomembranes. Electronic J. of Natutal Sci., *1*, 2, 2004.
- 8. *Op den Kamp JAF, Roelofsen B & van Deenen LLM* Structural and dynamic aspects of phosphatidylcholine in the human erythrocyte membrane. Trends Biochem Sci *8*, 320-323, 1985.
- 9. *Blume,A.* Dynamic properties.Phospholipid Handbook.Gregor Cevc (editor), Marcel Dekker, New York, 455-552, 1993.
- T J O'Leary. Lateral diffusion of lipids in complex biological membranes. Proc. Natl Acad Sci USA., 84, 2, 429–433, January 1987.
- 11. *Tanford, C.* The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes, 1st Ed. 1-200, John Wiley & Sons, New York 1973 New York, 1973.
- 12. Kevin R. MacKenzie, James H. Prestegard, Donald M. Engelman., A transmembrane helix dimmer: Structure and Implications. Science, 276, 4 131-133, april 1997.
- 13. Horia I. Petrache, Alan Grossfield, Kevin R. MacKenzie, Donald M. Engelman and Thomas B. Woolf, Modulation of Glycophorin A Transmembrane Helix Interactions by Lipid Bilayers: Molecular Dynamics Calculations., J. Molec. Biol., 302, 727-746. 2000.

Поступила 27.11.2009.