Исследование некоторых задач молекулярной биологии и химии поверхностно-активных соединений при помощи компьютерного эксперимента, проведенного на Армкластере

А. А. Шагинян, Г. А. Гарабекян, А. Г. Погосян, Л. Г. Арсенян
Международный научно-образовательный центр НАН РА,
Институт прикладных проблем физики НАН РА

В последнее время применение компьютерного эксперимента в научно-исследовательских 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 по применению методов физического эксперимента. Компьютерный эксперимент представляет собой симбиоз физического эксперимента и теории. С одной стороны цифровая модель системы строится по данным физического эксперимента, с другой стороны само исследование проводится при помощи воздействия силовых полей, описываемых формулами, на систему.

Исследования ученых последних лет показали, 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 реальным системам 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).

Компьютерные эксперименты были проведены на высокопроизводительном Армкластере НАН РА. На данный момент Армкластер является самой мощной высокопроизводительной системой на Кавказе, с пиковой производительностью 783,36 Гигафлоп и 2 Гб оперативной памяти на каждом узле. Узлы объединены в сеть при помощи высокоскоростной сети Myrinet (2 Гбит/с). Кластер работает под ОС Linux RedHat 9.0 с поддержкой SMP. Для визуализации молекулярной 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: (Langevin and Nose-Hoover Langevin piston methods)	320K и 1 атм
Модель воды:	TIP3
Биологическое время симулирования:	60—100 нсек.
Химическое время симулирования:	20—230 нсек.

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 времен. Основу метода составляет численное решение классических уравнений Ньютона для системы взаимодействующих частиц:

$$m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = F_i(r), \; i = 1,2,...,n \qquad (1)$$

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:

$$F_i(r) = -\frac{\partial U(r)}{\partial r_i}. \quad (2)$$

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:

$$T(t) = \frac{1}{3Nk_B}\sum_{i=1}^{n} m_i \nu_i^2 \quad (3)$$

$$\nu_i = \frac{dr_i}{dt} \quad (4)$$

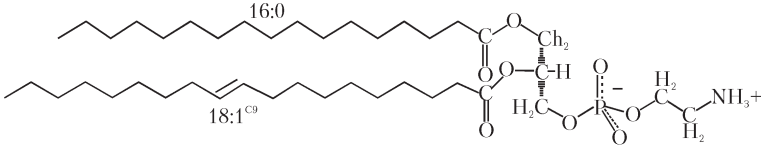
Здесь N — полное число степеней свободы молекулы, k_B — постоянная Больцмана. В случае изолированной системы $N = 3n - 6$, поскольку сохраняется ее полный импульс и момент импульса. Кроме того, в этом случае сохраняется полная энергия системы, а температура получается усреднением ее мгновенных значений $T(t)$ по некоторому интервалу времени.

Для моделирования методом МД нами использованы следующие файлы:

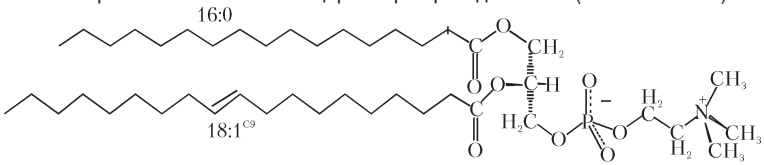
Файл координат атомов системы и файл топологий молекул модели, в котором содержатся параметры всех ковалентных связей, валентных и торсионных углов, и т. д., атомов системы. За основу были взяты типовые топологии фосфолипидных молекул с полярными головками фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина, содержащиеся 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 64 × 2 в случае мембраны и 256 × 2 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 пять типов фосфолипидов, имеющихся в мембране эритроцита человека [8].

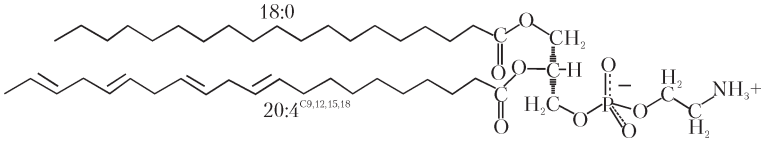
1-палмитоил-2-олеоил-СН-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (ПОФЭ) — 10 %



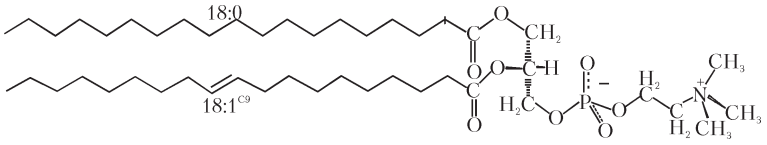
1-стеароил-2-олеоил-СН-глицеро-3-фосфатидилхолин (СОФХ — 12 %)

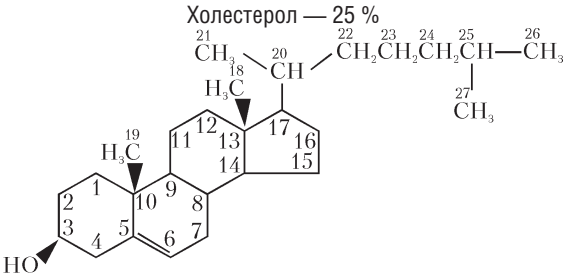


1-стеароил-2-арахидиноил-СН-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (САФЭ) — 12 %



1-палмитоил-2-олеоил-СН-глицеро-3-фосфатидилхолин (ПОФХ) — 13 %



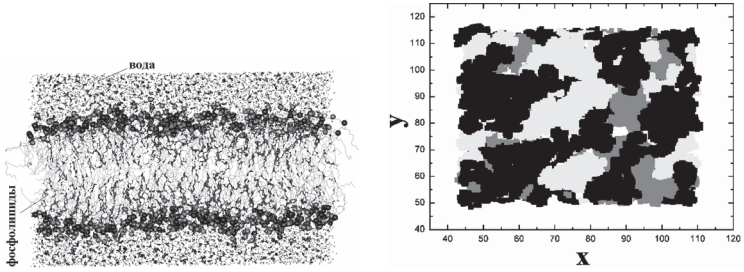


В фосфолипидную мембрану ввели также важный функциональный белок характерный для эритроцита: Гликофорин А.

В качестве ПАВ использованы Додецилсульфат натрия- $C_{12}H_{25}SO_4Na$ и Пентадецилсульфонат натрия — $C_{15}H_{31}SO_3Na$, промышленной марки Е-30 и К-30.

Результаты компьютерного эксперимента

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



а б

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 плоскости x—y

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

Если это предположение верно, то оно должно сказываться на процессе 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 $x-y$) воспользовались формулой, описывающей зависимость среднеквадратичного отклонения центра тяжести отдельных типов фосфолипидов (MSD) от времени:

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

где $\vec{r}(t)$ и $\vec{r}(0)$ 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:

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

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

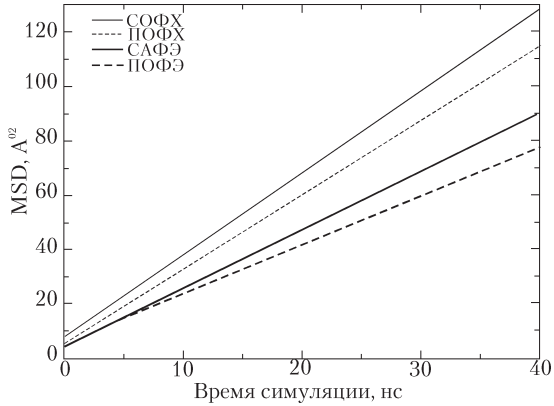


Рис. 2. Зависимость MSD от времени симуляции для фосфолипидов: СОФХ, ПОФХ, САФЭ и ПАФЭ в мембране эритроцита

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

Таблица 1

Коэффициенты латральной диффузии для разных фосфолипидов в мембране

Фосфолипиды	**СОФХ**	**ПОФХ**	**САФЭ**	**ПОФЭ**
Кооффициент диффузии ($см^2/с$)	$4{,}2\times10^{-8}$	$3{,}7\times10^{-8}$	$2{,}9\times10^{-8}$	$2{,}6\times10^{-8}$

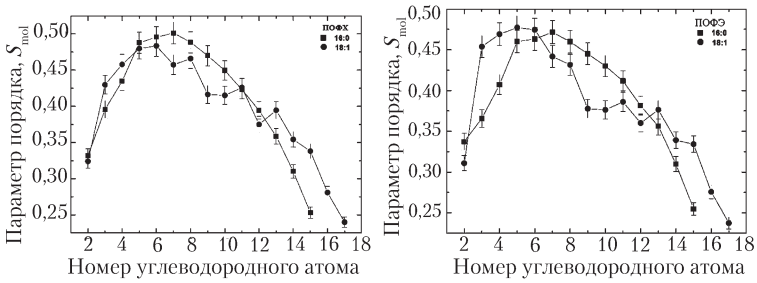
В настоящее время, методы физического эксперимента позволяют измерять коэффициенты латеральной диффузии только для искусственных бимолекулярных слоев, состоящих из одного типа фосфолипида [9, 10]. Сравнивая значения коэффициентов латеральной диффузии для бислоев отдельных фосфолипидов и мембраны эритроцита, содержащей все эти фосфолипиды, обнаруживаем их 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. 1б.

В динамике при симулировании до 100 нс 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:

$$S_{\text{mol}} = \left| \frac{3}{4} < \cos^2 \theta_i > -\frac{1}{4} \right|,$$

где θ_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 $S_{\text{mol}} = 0{,}5$, а если перпендикулярно, то $S_{\text{mol}} = 0{,}25$.

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



а б

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, обусловленное вероятно тем, что глицерольная группа расположена перпендикулярно к нормали поверхности бислоя. По мере удаления от глицерольной группы в глубь бислоя углеводородные цепочки становятся конформационно более свободными и начинают ориентироваться преимущественно параллельно к нормали поверхности бислоя. Дальнейшее удаление 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 экспериментально методом ЯМР спектроскопии и компьютерным экспериментом для дипальмитоилфосфатидилхолина, хорошо согласуются.

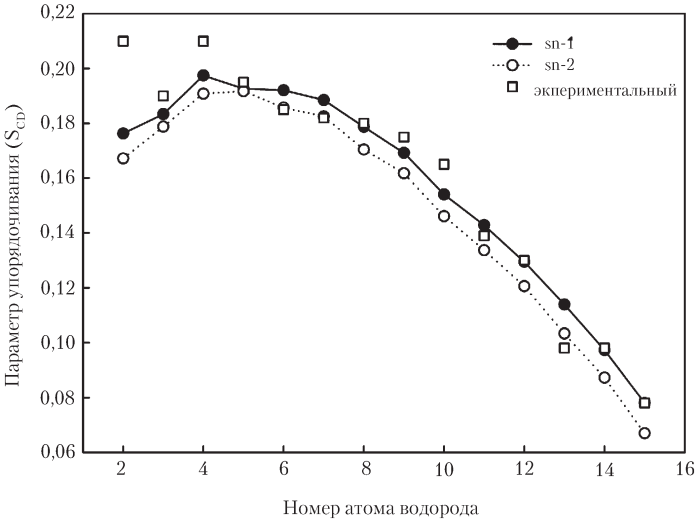


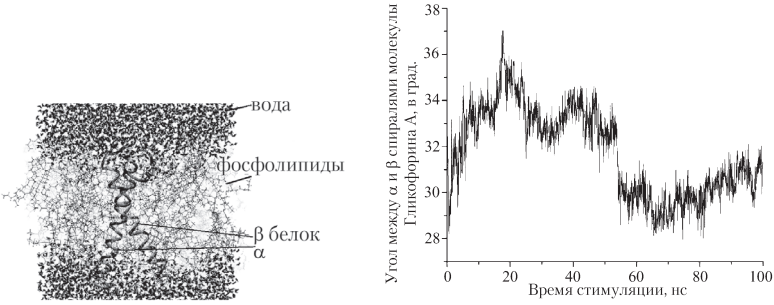
Рис. 4. Ориентационные параметры порядка углеводородных цепочек молекул дипальмитоилфосфатидилхолина, полученные физическим экспериментом и моделированием

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].

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 Гикофорин А.

Рассмотрим динамику поведения α и β субединиц Гликофорин А в мембране. На рис. 5б представлена зависимость угла наклона между α и β субединицами белка внутри мембраны.



а б

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

Имеются работы, где методами ЯМР-спектроскопии и динамического моделирования изучено влияние структуры молекул фосфолипида, на конформацию Гликофорина А для исскуственной 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_2-групп и двойных связей углеводородных цепей фосфолипидов увеличивается угол между спиралями димера гликофорина. Показано, что при увеличении числа CH_2-групп в углеводородных цепочках молекул фосфолипида с 14 до 18, угол между спиралями в среднем достигает величины 11 градусов. В нашем случае, где вместо гомогенной фосфолипигной мембраны исследуется гетерогенная мембрана с молекулами фосфолипидов имеющих углеводородные цепочки с числом CH_2-групп от 16 до 20, в среднем угол имеет значение порядка 30 градусов. 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 рисунка, 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 отсутствии белка и проникновение в мембрану в присутствии Гликофорина А.

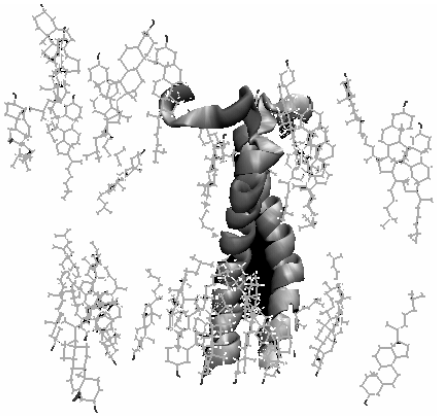
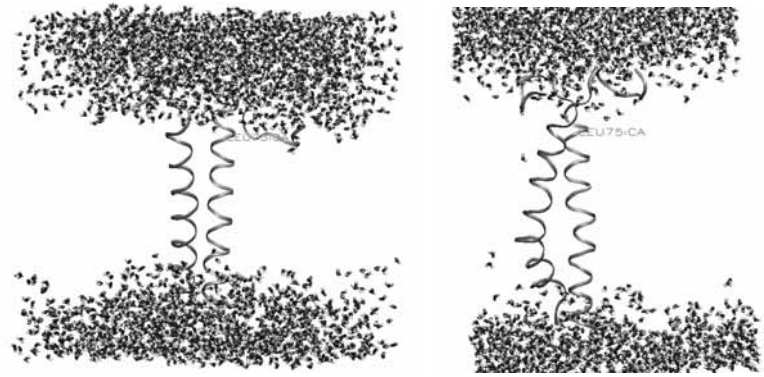


Рис. 6. Белок в окружении холестерина.
Молекулы остальных фосфолипидов и воды на рисунке не показаны

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



а б

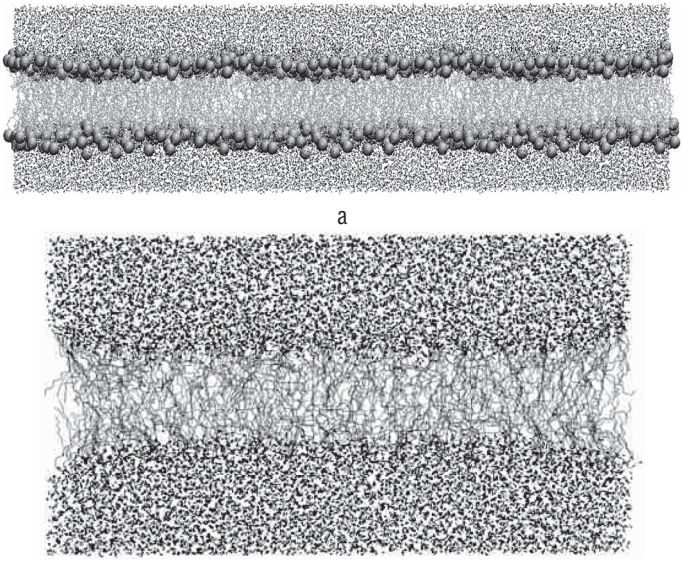
Рис. 7. Стартовое состояние мембраны эритроцита (а), и после 100 нс симуляции. Молекулы фосфолипида на рисунке не показаны

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

Плоские мицеллы ПАВ в воде. Водно-мицеллярные растворы ПАВ имеют большое применение в химии и биологи, в частности: в эмульсионной полимеризации, в нефтехимии, в мицеллярном катализе, в фармакологии, в экологии и санитарии и т. д, выступая в качестве солюбилизирующего агента, способствующего растворению водонерастворимых жидкостей в водно-мицеллярной системе.

Многие структурные свойства водно-мицеллярных растворов ПАВ можно исследовать различными физическими методами в высококонцентрированных водных растворах ПАВ в жидкокристаллическом состоянии.

В настоящей работе нами впервые предпринята попытка, при помощи компьютерного эксперимента, исследовать плоские мицеллы Додецилсульфат натрия-$C_{12}H_{25}SO_4Na$ (ДДС) и Пентадецилсульфонат натрия-$C_{15}H_{31}SO_3Na$(ПДС) в ламеллярной, жидкокристаллической фазе.



а

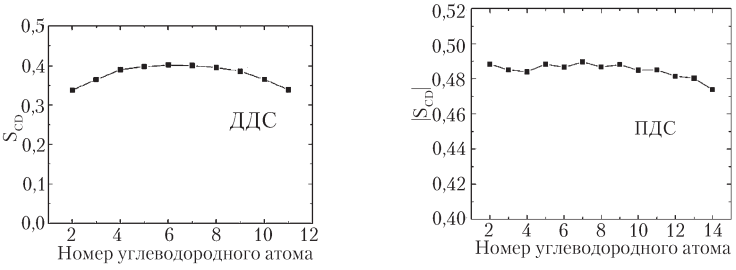
б

Рис. 8. Равновесная модель плоской мицеллы ДДС (а) и ПДС (б) в воде, в ламеллярной жидкокристаллической фазе

Исследования проводились по той же методике, что и мембраны эритроцита. Время симуляции до 230 нс.

На рис. 8 представлена равновесная модель плоских мицелл ДДС и ПДС в водном окружении.

Одним из главных параметров, определяющих структуру мицеллы ПАВ, который можно измерять при помощи физического эксперимента, является коэффициент ориентационного порядка углеводородных цепочек молекул ПАВ.



а б

Рис. 9. Зависимость параметра ориентационного порядка углеводородных цепочек молекул ДДС (а) и ПДС (б) от глубины погружения в мицеллу

На рис. 9. представлены зависимости параметра ориентационного порядка углеводородных цепочек молекул ДДС и ПДС от глубины погружения в мицеллу.

Данные, полученные компьютерным экспериментом, хорошо совпадают с данными физического эксперимента [14, 15].

Таким образом, показана возможность применения компьютерного эксперимента для исследования сложных биологических и химических систем.

Литература

1. **Tieleman D. P., Berendsen H. J. C.** Molecular dynamics simulations of a fully hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with different macroscopic boundary conditions and parameters. // J. Chem. Phys. — 1996. — 105. — P. 4871—4880.

2. **Tu K., Tobias D. J., Klein M. L.** Biophys. J. — 1995. — 69. — P. 2558—2562.

3. **Chiu S. W., Clark M., Balaji V., Subramaniam S., Scott L. H., Jakobsson E.** Biophys. J. — 1995. — 69. — P. 1230—1245.

4. **Lindahl E., Hess B., D. van der Spoel.** J. Mol. Mod. — 2001. — 7. — P. 306—317.

5. **Brooks B. R., Bruccoleri R. E., Olafson B. D., States D. J., Swaminathan S., Karplus M.,** CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations // J. Comput. Chem. — 1983. — 4. — P. 187—217.

6. **Pogosyan A. H., Yegiazaryan G. A., Gharabekyan H. H., Shahinyan A. A.** Commun. Comput. Phys. — 2006. — Vol. 1. — № 4 — P. 736—743.

7. **Shahinyan A. A., Pogosyan A. H., Yegiazaryan G. A., Gharabekyan H. H.** Electronic J. of Natutal Sci. — 2004. — 1 (2).

8. Op den Kamp JAF, Roelofsen B & van Deenen LLM (1985) Structural and dynamic aspects of phosphatidylcholine in the human erythrocyte membrane. rends Biochem Sci 8: 320—323.

9. **Blume A.** Dynamic properties. In Phospholipid Handbook / Ed. by G. Cevc. — New York : Marcel Dekker, 1993. — P. 455—552.

10. **O'Leary T. J.** Proc Natl Acad Sci USA. January. — 1987. — 84(2). — P. 429—433.

11. **Tanford C.** 1973 in The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes, 1st Ed. — N. Y. : John Wiley & Sons. — P. 1—200.

12. **MacKenzie K., Prestegard J., Engelman D.** A transmembrane helix dimmer: Structure and Implications // Science. — 4 april. — 1997. — Vol. 276. — P. 131—133.

13. **Petrache H., Grossfield A., MacKenzie K., Engelman D., Woolf Th.** Modulation of Glycophorin A Transmembrane Helix Interactions by Lipid Bilayers : Molecular Dynamics Calculations. // J. Molec. Biol. — 2000. — 302. P. 727—746.

14. **Kekicheff P., Grabielle-Madelmont C., Ollivon M.** Journal of Colloid. and Interface Science. — 1989. — 131. — P. 112.

15. **Шагинян А. А.** Роль структурной организации ионных мицелл в механизме формирования макромолекул в эмульсии. — Ереван : Изд. АН Арм ССР, 1985.