

На правах рукописи

Смолинская Юлия Юрьевна

**Моделирование структуры и мембранной
топологии цитохрома b5**

03.00.04 «биохимия»

Автореферат

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва 2005

Работа выполнена в ГУ НИИ биомедицинской химии
им. В.Н.Ореховича РАМН

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Иванов Алексей Сергеевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
кандидат химических наук

Соколов Николай Николаевич
Палюлин Владимир Александрович

Ведущая организация:

Российский государственный медицинский университет

Защита диссертации состоится "16" мая 2005 г. в 13 часов
на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 при ГУ НИИ
биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН по адресу:
119121, Москва, ул.Погодинская, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ биомедицинской
химии им. В.Н. Ореховича РАМН.

Автореферат разослан "16" мая 2005 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат биологических
наук



В.С. Былинкина

2007-4
6699

2397014

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Введение. Актуальность темы

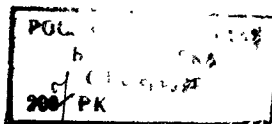
Микросомальный цитохром b5 (b5) является мембранным белком, который находится в эндоплазматическом ретикулуме. Основной его физиологической функцией является латеральный и межмембранный перенос электронов, включая восстановление цитохромов P450 (Archakov, 1974), реакции десатурации жирных кислот (Strittmatter, 1974), биосинтез холестерина (Clarke, 2004) и реакции гидроксирования (Vergeres G, 1995).

Цитохром b5 представляет собой двухдоменный мембранный белок, "заякоренный" С-концом в мембране. С помощью трипсина он может быть разделен на водорастворимый гемсодержащий глобулярный домен, сохраняющий физико-химические и окислительно-восстановительные свойства b5, и мембранный гидрофобный домен (Tajima, 1978). Пространственная структура водорастворимого фрагмента была решена с помощью рентгеноструктурного анализа (Mathews, 1972a; Mathews, 1972b) и доступна в белковом банке PDB (Berman, 2000). Пространственная структура мембраносвязанного домена до сих пор остается неизвестной. Различные авторы предполагают 2 возможные мембранные топологии этого домена. Согласно одной из них мембранный участок b5 имеет форму петли - С-конец белка выходит из мембраны с той же стороны, где расположен белок (Ozols, 1989; Tajima, 1980). По другой гипотезе - мембранный домен b5 является трансмембранным и пересекает мембрану насквозь (Vergeres, 1995).

Анализ пространственной структуры белков базируется на комбинации методов молекулярной биологии, биохимии, ЯМР и кристаллографии (McPherson, 2002; Drenth, 1994). Однако, такие подходы пригодны в основном для водорастворимых белков, поэтому определены пока только единичные структуры мембранных белков. Это обусловлено существующими проблемами их экспрессии и кристаллизации. Дефицит данных о молекулярном строении мембранных белков стимулирует применение методов молекулярного моделирования (Chang, 1996).

Поскольку конформация мембраносвязанных частей белков обусловлена взаимодействием с липидным бислоем, то для корректного моделирования мембранных белков необходимо использовать адекватную среду в виде модели липидного бислоя с двумя водными фазами с обеих сторон. В последние годы моделированию таких белков в мембранном окружении было посвящено много работ (Saiz, 2002; Forrest, 2000; Tieleman, 1997). Однако, до сих пор существует проблема создания адекватной модели липидного бислоя, хорошо отражающей свойства биологической мембраны.

Оценку достоверности построенной модели бислоя и ее пригодности для моделирования мембранных белков необходимо проводить на основе расчетных и экспериментальных данных (Ивков, 1981; Ивков, 1982). Для верификации модели бислоя могут быть использованы такие расчетные



параметры, как объем и площадь поверхности бислоя, приходящиеся на одну молекулу фосфолипида; распределение различных групп атомов вдоль нормали к бислою; ориентация отдельных метиленовых фрагментов алифатической цепи (параметр порядка) (McCabe, 1994).

Для проверки пригодности модели бислоя для моделирования структуры и топологии мембранных белков необходимо также выполнение контрольного моделирования с использованием похожего по структуре мембранной части периферического белка с известной структурой и мембранной топологией. В белковом банке PDB (Berman, 2000) имеется всего 88 структур мембраносвязанных белков (http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html), большинство которых является большими интегральными белками (Ulmschneider, 2001). Поэтому в качестве контрольного мембраносвязанного периферического белка нами был выбран фермент моноаминоксидаза А (МАО А). Его структура и мембранная топология недавно были решены методами белковой кристаллографии (Ma, 2004).

Цель работы

Моделирование пространственной структуры цитохрома b5 в мембранном окружении и анализ возможных вариантов топологии мембраносвязанного домена этого белка.

Основные задачи:

1. Создать равновесную модель фосфолипидного бислоя из молекул дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) в водном окружении.
2. Проверить пригодность модели фосфолипидного бислоя для моделирования периферических мембранных белков на примере моноаминоксидазы А (МАО А).
3. Выполнить моделирование структуры и мембранной топологии цитохрома b5 в мембранном окружении в виде полноатомной модели липидного бислоя и двух водных фаз.
4. Выполнить анализ возможных вариантов мембранной топологии цитохрома b5 и сравнить их с известными экспериментальными данными.

1.2. Научная новизна и практическая значимость работы

Построена модель липидного бислоя, которая хорошо согласуется с известными экспериментальными данными (объем и площадь, занимаемые одной молекулой ДПФХ, толщина бислоя, порядок ацильных цепей, профили плотности атомов). На примере мембранного белка МАО А было показано, что модель бислоя может быть использована для моделирования различных мембранных белков.

Впервые выполнено моделирование молекулярной динамики полноразмерного цитохрома b5 в мембранном окружении в трансмембранной и петлевой топологиях. Моделирование показало стабильность обоих

вариантов, что предполагает существование b5 в двух топологиях и объясняет противоречивые экспериментальные данные.

Впервые показано, что конформация участка, соединяющего водорастворимый и мембраносвязанный домены может играть важную функциональную роль в регуляции взаимодействия цитохрома b5 с редокс-партнерами.

Полученные модели полноразмерного цитохрома b5 могут быть использованы для изучения взаимодействия цитохрома b5 с редокс-партнерами.

1.3. Апробация работы

Основные положения диссертации были доложены на следующих конференциях:

1. 2th International conference “Genomics, Proteomics and Bioinformatics for Medicine” (Moscow-Ples-Moscow, 2004);
2. XII Российский Национальный Конгресс “Человек и лекарство” (Москва, 2005);
3. 4-ая Национальная конференция “Информационно-вычислительные технологии в решении фундаментальных научных проблем и прикладных задач химии, биологии, фармацевтики, медицины” (Москва, 2005);
4. 4-ая Всероссийская конференция “Молекулярное моделирование” (Москва, 2005);
5. 14th International Conference on Cytochromes P450: Biochemistry, Biophysics and Bioinformatics (Dallas, USA, 2005).

Апробация диссертации состоялась 5 мая 2005 года на межлабораторном семинаре ГУ НИИ биомедицинской химии им В.Н. Ореховича РАНХ.

По теме диссертации опубликовано 6 работ.

1.4. Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 114 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, объекты и методы, результаты, обсуждение, выводы и список литературы. Работа иллюстрирована 4 таблицами и 53 рисунками; библиографический указатель включает 153 публикации.

1.5. Положения, выносимые на защиту

1. Построена модель липидного бислоя из ДПФХ, которая хорошо согласуется с экспериментальными данными. На примере мембранного белка MAO A, структура которого известна, показано, что модель бислоя может быть успешно использована для моделирования и изучения топологии мембранных белков.
2. Построены модели цитохрома b5 в мембранном окружении в трансмемб-

ранной и петлевой топологиях. Моделирование молекулярной динамики показало стабильность обоих вариантов, что предполагает существование b5 в двух топологиях и объясняет противоречивые экспериментальные данные.

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Конструирование липидного бислоя и систем белок/бислоя проводили с использованием молекулярно-графического пакета Sybyl (Sybyl 6.3-6.9) фирмы Tripos на сервере Silicon Graphics Origin350 (8×R16000-700) под управлением операционной системы IRIX 6.5. Вычислительная часть работы выполнялась с использованием программы Gromacs 3.2 (Berendsen, 1995) на кластере из 16 2-х процессорных узлов на базе AMD MP 2400+ МГц, соединенных сетью Fast Ethernet под ОС Red Hat Linux 7.3. Для предсказания вторичной структуры мембраносвязанного домена цитохрома b5 были использованы программы ALB (Ptitsyn, 1983), PHD (Rost, 1993), PROF (Rost, 1994). Анализ полученных результатов проводился на персональных компьютерах Pentium под управлением операционной системы Windows 2000.

В работе были использованы пространственная структура водорастворимого домена цитохрома b5 из микросом печени быка (индекс PDB 1CYO) (Durley, 1996), структура моноаминоксидазы A (индекс PDB 1O5W) (Ma, 2004), депонированные в белковой базе данных Protein Data Bank (PDB) (Berman, 2000). Из Кембриджской базы данных CSD (Allen, 2002) были взяты структуры холина (индекс ACCNOB11) и глицерофосфата (индекс DANJAX).

Конструирование молекулы ДПФХ. Модель трехмерной структуры дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) была построена с помощью модуля Biopolymer (Sybyl 6.9) на основе известных структур холина и глицерофосфата, а также остатков пальмитиновой кислоты. Расчет парциальных зарядов липидов проводили полуэмпирическим квантовомеханическим методом AM1 (Sybyl 6.9).

Конструирование липидного бислоя из ДПФХ. Молекула ДПФХ была размножена с использованием макроса программы Sybyl 6.9 и из полученных копий построена первичная модель бислоя. Каждый монослой состоял из 169 молекул ДПФХ, а бислой соответственно содержал 338 молекул. С применением модуля “editconf” (Gromacs 3.2) была выполнена процедура масштабирования, с помощью которой задавался объем ячейки. Используя модуль “genbox” (Gromacs 3.2) ячейку заполняли молекулами воды. С каждой стороны бислоя было добавлено около 15000 молекул воды.

Оптимизация бислоя из ДПФХ. Для оптимизации структуры бислоя и моделирования МД были использованы параметры силовых полей GROMOS и Lipid (Berger, 1997), а также модель SPC (Berendsen, 1984) для воды. Моделирование МД было выполнено при периодических граничных условиях, постоянном давлении (1бар) (Berendsen, 1984) и температуре

(323°K) (Nose, 1984; Hoover, 1985). Для уменьшения объема расчетов при оценке дальнедействующих невалентных взаимодействий применяли функцию двухдиапазонной “отсечки” (Berger, 1997; Lindahl, 2000) с параметрами 1,0 нм/1,8 нм: взаимодействия на расстояниях до 1,0 нм рассчитывали на каждом шаге моделирования МД, а на расстояниях 1,0-1,8 нм - через каждые 10 шагов.

Верификация модели мембраны. Для верификации модели бислоя были рассчитаны объем, занимаемый одной молекулой липида, площадь проекции “головки” одной молекулы липида, параметр порядка (S_{CD}), профили распределения плотности атомов в ячейке поперек плоскости мембраны, которые сравнивались с экспериментальными данными. По этим данным полученный бислой находится в хорошем соответствии с параметрами жидко-кристаллического состояния.

Подтверждение пригодности модели бислоя из ДПФХ для моделирования мембранных белков. В качестве контрольного объекта для подтверждения пригодности модели бислоя как среды моделирования структуры и топологии мембранных белков была использована пространственная структура моноаминоксидазы А (MAO А) (код PDB 1O5W) (Ma, 2004). Встраивание белка в оптимизированную модель бислоя из ДПФХ осуществлялось вручную с помощью средств программного комплекса Sybyl 6.9. Моделирование МД с MAO А показало устойчивость последней.

Конструирование цитохрома b5 в петлевой и трансмембранной топологиях. В связи с тем, что топология мембраносвязанного домена цитохрома b5 и его ориентация относительно водорастворимого домена неизвестна, были проанализированы все конформационные возможности и выбраны крайние возможные конформации этого участка. Таким образом, были получены две модели b5 в трансмембранной топологии и две модели в петлевой топологии. Все четыре модели были оптимизированы с помощью процедуры минимизации энергии программы Sybyl для уменьшения конфликтов, возникших при конструировании моделей вручную.

Оптимизация модели бислоя для моделирования цитохрома b5 в трансмембранной и петлевой топологиях. Для моделирования цитохрома b5 в Т-топологии была подготовлена модель бислоя со сквозным отверстием для встраивания трансмембранного домена цитохрома b5. Для этого было выполнено непродолжительное моделирование МД бислоя с белком, который был вставлен перпендикулярно поверхности бислоя. В связи с тем, что моделирование МД проводилось при переменном объеме, молекулы липидов разошлись, образуя отверстие для мембраносвязанного домена белка.

Для моделирования цитохрома b5 в П-топологии модель бислоя была модифицирована другим образом. Из одного монослоя были удалены 23 молекулы ДПФХ для освобождения места под цитохром b5 в П-топологии. В результате в монослой образовалась полость и он содержал соответственно всего 146 молекул ДПФХ.

Оптимизация цитохрома b5. Среднеквадратичное отклонение аминокислотных остатков (RMS) в процессе моделирования МД определялось как отклонение координат остатков от их начального положения в течение времени. Для верификации было проведено сравнение RMS моделей и оценочных значений RMS, вычисленных из кристаллической структуры на основе B-фактора (Storch, 1995).

Доступная липидам площадь поверхности белка ($S_{\text{ДПФХ}}$) вычислялась как разность площади поверхности белка в водном окружении и доступной для воды площади поверхности белка, находящегося в бислое.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Построение и оптимизация модели липидного бислоя из ДПФХ

Модель структуры дипальмитоилфосфатидилхолина была построена с использованием известных пространственных структур холина и глицерофосфата (коды ACCNOB11 и DANJAX, соответственно) из Кембриджской базы данных CSD (Allen et al., 2002) и моделей пальмитиновой кислоты (рис. 1).

Молекула ДПФХ была размножена и из полученных копий построена первичная модель бислоя (рис. 1). Каждый монослой состоял из 169 молекул ДПФХ, а бислоем, соответственно, содержал 338 молекул. Далее была выполнена процедура масштабирования, с помощью которой задавался первоначальный объем ячейки. Он определялся как объем, занимаемый одной молекулой ДПФХ, определенный экспериментально, + 8% для обеспечения свободной динамики молекул липида при оптимизации, умноженный на количество молекул липида. Таким образом, сконструированная ячейка имела следующие линейные размеры: $L_x \times L_y \times L_z = 9,2 \times 9,2 \times 5,2$ нм, соответственно. С каждой стороны бислоя было добавлено примерно 15000 молекул воды, что увеличило высоту ячейки (L_z) до 15,6 нм (рис. 1). Этот размер ячейки был использован при моделировании взаимодействий белка с бислоем.

Моделирование молекулярной динамики бислоя из ДПФХ. При моделировании молекулярной динамики (МД) бислоя в первые 10 пс наблюдали ряд переходных процессов, визуально выражавшихся в значительном (до 1,0 нм) расхождении листков бислоя (рис. 2). В следующие 20 пс происходило восстановление и стабилизация системы - листки бислоя сходились и он принимал нормальный вид. Подобные переходные процессы с расхождением листков бислоя были отмечены ранее (Heller et al., 1993). Это обусловлено, по-видимому, большим количеством стерических конфликтов в первоначальной структуре бислоя, сконструированной вручную. Дальнейшее длительное моделирование МД в течение 3,5 нс показало высокую стабильность мембраны.

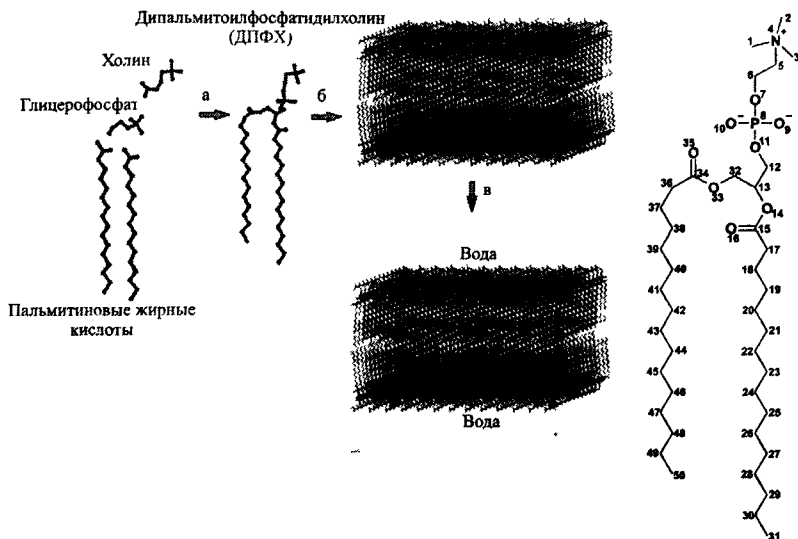


Рисунок 1. Схема конструирования первоначальной модели бислоя (слева) и химическая структура ДПФХ с нумерацией всех тяжелых атомов (справа). Построение модели ДПФХ (а), построение модели бислоя (б), создание водных фаз с двух сторон бислоя (в).

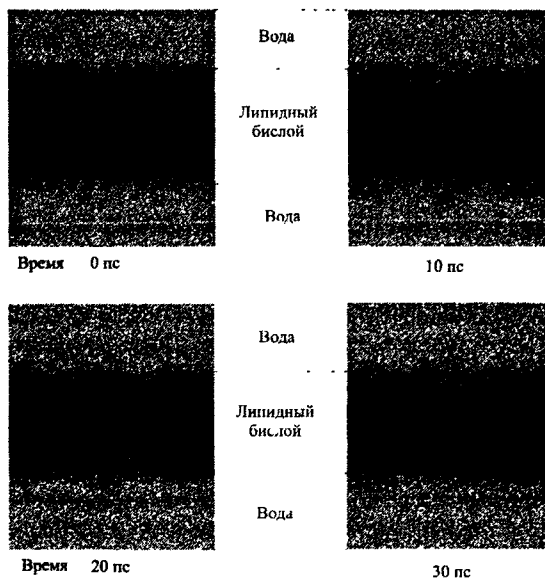


Рисунок 2. Изменение структуры бислоя из ДПФХ при моделировании МД. Структура бислоя показана на разных этапах моделирования МД в интервале от 0 до 30 пс. Атомы углерода показаны зеленым цветом, кислорода – красным, водорода – белым, азота – голубым, фосфора – фиолетовым, фон – синим.

Анализ результатов моделирования МД бислоя из ДПФХ. Равновесие системы было достигнуто после 1,3 нс моделирования МД. Для анализа свойств бислоя были использованы данные на участке равновесной траектории 2,5 - 3,5 нс. Средние значения макроскопических параметров бислоя приведены в таблице 1. Полученные данные хорошо согласуются с экспериментальными значениями (Nagle, 1993; Nagle et al., 1988). Значения объема и площади, занимаемые одной молекулой липида, вычисленные из модели сравнивались с экспериментальными значениями, полученными в разных состояниях липидного бислоя - жидко-кристаллическом и состоянии геля. По этим данным полученный нами бислой находится в жидко-кристаллическом состоянии. Также о жидко-кристаллическом состоянии свидетельствует самоориентация ацильных цепей липидов. Наша модель бислоя имеет значения объема и площади, занимаемые одной молекулой липида, $0,6 \text{ нм}^2$ и $1,2 \text{ нм}^2$ соответственно, эти значения входят в диапазон полученных ранее на других бислоях из ДПФХ: объем от $0,53$ до $0,65 \text{ нм}^2$ (Takaoka, 2000), площадь от $1,18$ до $1,22 \text{ нм}^2$ (Hofsass, 2003; Takaoka, 2000).

Профили распределения плотности атомов и групп атомов в ячейке вдоль нормали Z к мембране показаны на рис. 3. Видно, что распределение атомов хорошо согласуется как с известными экспериментальными данными (Nagle, 1996), так и более ранними моделями (Такаока, 2000). Уменьшение плотности атомов примерно в два раза в середине бислоя ($Z \approx 7,5 \text{ нм}$) также согласуется с экспериментальными данными (Franks, 1977). Вода заходит в область полярных головок липидов, в результате чего гидрофобная часть бислоя, не содержащая воду, составляет примерно $2,0 - 2,5 \text{ нм}$, что также согласуется с известными экспериментальными данными (Egberts et al., 1994).

Параметр порядка (S_{CD}) вдоль жирнокислотных остатков липидов представлен на рис. 4. Видно, что кривая изменения S_{CD} , рассчитанная для системы после 3,5 нс моделирования МД, также согласуется с экспериментальными данными (Seelig, Seelig, 1974) - имеется плато в центральной области цепей (углеродные атомы с номера 17 по 23) и снижение S_{CD} в концевой части (углеродные атомы с номера 24 по 30) (Lafleur et al., 1990; Seelig et al., 1977). В середине мембраны $S_{CD} = 0,1$, что свидетельствует о наибольшей подвижности концевых групп.

Для оценки пригодности построенной модели мембраны для моделирования мембранных белков нами был выполнен контрольный эксперимент по моделированию мембраносвязанного белка с известной структурой и мембранной топологией. Для этого была использована пространственная структура моноаминоксидазы А (МАО А).

Мембраносвязанный домен МАО А состоит из короткого неупорядоченного фрагмента и α -спирали. Моделирование МД в системе

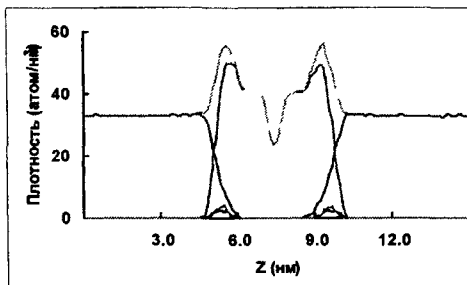
Таблица 1. Сравнение полученных расчетных и известных экспериментальных значений макроскопических параметров бислоя из ДПФХ.

Параметр	Модель	Эксперимент		Ссылка
		Гель	Жидкий кристалл	
S (липид), нм ²	0,6	0,52 (25°C)	0,71 (50°C)	Lis et. al., 1982
		0,50 (21°C)	0,68 (50°C)	Janiak, 1979
		0,49 (25°C)		Tardieu, 1973
		0,49 (25°C)	0,68 (50°C)	Rand, Parsegian, 1989
		0,48 (20°C)		Sun, 1994
			0,63 (50°C)	Nagle, 1996
			0,57 (50°C)	Buldt, 1979
			0,67 (44°C)	Lewis, Engelman, 1983
V (липид), нм ³	1,2	1,14 (20°C)	1,23 (50°C)	Wiener, 1988
		1,14 (20°C)		Blazyk, 1979
		1,14 (20°C)	1,23 (50°C)	Nagle, 1978
		1,14 (20°C)	1,23 (50°C)	Laggner, 1976
			1,23 (50°C)	Schmidt, Knoll, 1985
L _z , нм	5,9	6,2		Nagle, 1993
Углерод 19- углерод 19*, нм	2,3	2,4		Buldt, 1979
Углерод 29- углерод 29*, нм	0,7	0,7		Buldt, 1979

Примечание: S (липид) – площадь проекции “головки” одной молекулы липида, V (липид) – объем, занимаемый одной молекулой липида, L_z – толщина бислоя, * – расстояния между соответствующими атомами из разных листов бислоя.

вода/белок/бислоем было выполнено в 2 этапа. На первом этапе мембраносвязанный домен MAO A встроили в равновесную модель бислоя. Моделирование МД системы выполняли в течение 2,0 нс. Стабильное состояние было достигнуто через 0,5 нс. Сравнение мембраносвязанного домена MAO A после моделирования МД и кристаллической структуры показало незначительные изменения в топологии неупорядоченного домена, в то время как структура α-спирали не изменилась. Структурное выравнивание основной цепи этого домена и соответствующего участка из кристаллической структуры MAO A показало хорошее соответствие (RMS = 2,22 Å).

а



б

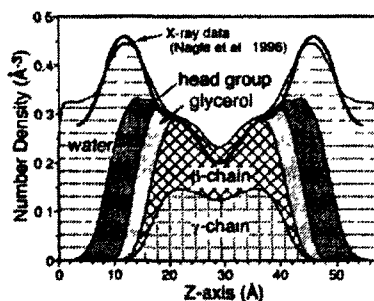


Рисунок 3. Профили плотности атомов в ячейке вдоль нормали Z к поверхности мембраны (а) и соответствующие значения из эксперимента (б) (рисунок взят из Такаока, 2000).

- бислой из ДПФХ,
- вода,
- система ДПФХ/вода,
- группы PO_4 ,
- группы $\text{N}(\text{CH}_3)_3$.

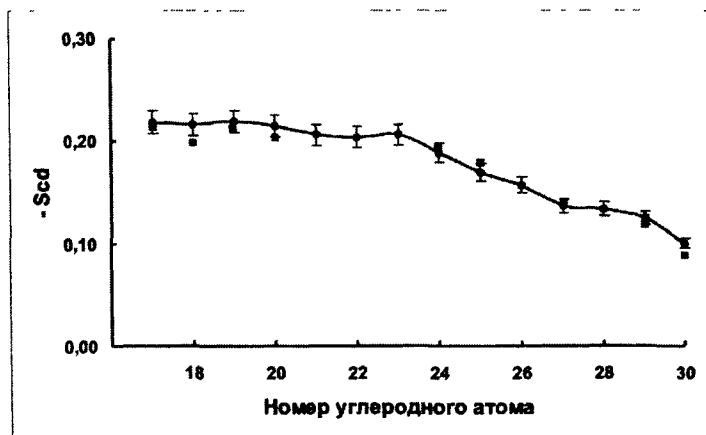


Рисунок 4. Параметр порядка (S_{CD}) атомов жирнокислотных остатков липидов после моделирования МД (черный цвет) и экспериментальные значения (красный цвет) (Seelig, Seelig, 1974).

На втором этапе водорастворимый домен MAO A был присоединен к оптимизированному мембраносвязанному домену. Моделирование МД MAO A в бислое было выполнено в течение 2,0 нс. Система вода/бислой/белок

достигла равновесия через 0,4 нс. Пространственное совмещение основных цепей MAO A после моделирования МД и кристаллической структуры также показало хорошее соответствие ($RMS = 2,45 \text{ \AA}$) (рис. 5а).

Для оценки роли бислоя в поддержании нативной конформации мембранной части белка был выполнен контрольный эксперимент по моделированию МД MAO A в воде (без бислоя) в течение 1,0 нс. Уже после первых 30 пс моделирования МД топология мембраносвязанного участка белка нарушается (в основном α -спираль). Система достигла равновесия только когда α -спираль мембраносвязанного участка приблизилась к глобулярной части белка (рис. 5б). Такое поведение мембранного белка в воде согласуется с ранее описанными аналогичными результатами (Dubovskii et al., 2000).

Таким образом, нами была построена модель липидного бислоя, которая хорошо согласуется с известными экспериментальными данными и на примере мембранного белка MAO A была показана ее пригодность для корректного моделирования структуры и топологии периферических мембранных белков.

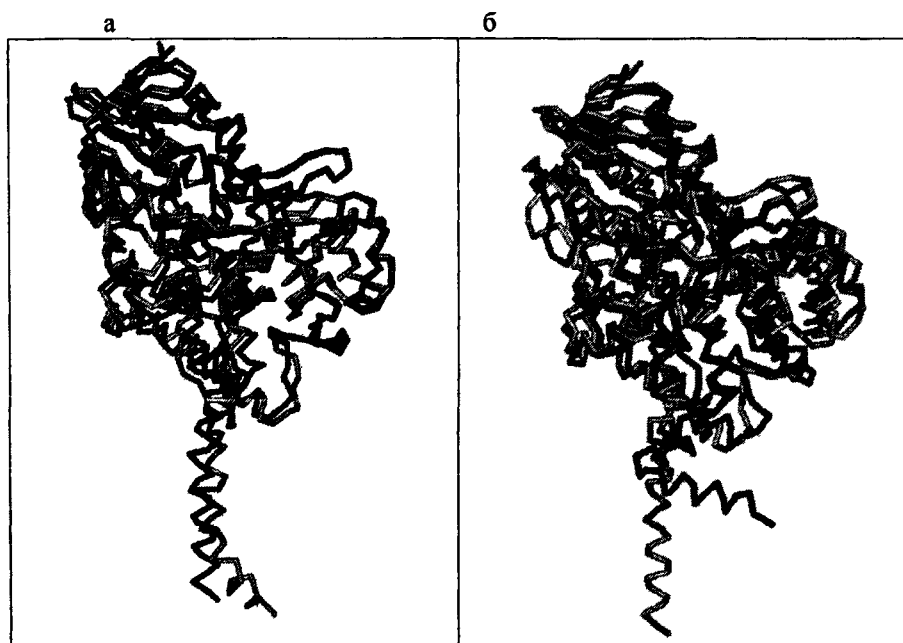


Рисунок 5. Пространственное совмещение основных цепей кристаллической структуры MAO A (светлый цвет) и модели (темный цвет) после моделирования МД в течение 2,0 нс в мембранном окружении (а), после моделирования МД в течение 1,0 нс в воде (б).

3.2 Моделирование цитохрома b5 в мембранном окружении

Пространственная структура водорастворимого фрагмента микросомального цитохрома b5 из печени быка была решена методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1,5 Å (индекс PDB 1CYO) (Durley et al., 1996) и доступна в белковом банке PDB (Berman et al., 2000). В тоже время пространственная структура мембраносвязанного домена до сих пор остается неизвестной.

Существуют два предположения о структуре мембраносвязанного домена b5. Согласно первому мембранный участок b5 имеет форму петли (П-топология) - С-конец белка выходит из мембраны с той же стороны, где расположен белок (Ozols, 1989; Tajima, 1980) (рис. 6а). По другой гипотезе - мембранный домен b5 является трансмембранным и пересекает мембрану насквозь (Т-топология) (Vergeres, 1995) (рис. 6б).

Современные компьютерные технологии пока не могут адекватно моделировать процесс встраивания белка в бислой. В связи с этим нами было выполнено моделирование микросомального цитохрома b5 в двух альтернативных конформациях мембранного якоря, встроенного в оптимизированный бислой. Для этого была использована пространственная структура водорастворимого домена цитохрома b5 из печени быка (аминокислотные остатки 5-88) и модель мембранного домена (аминокислотные остатки 89-133), построенная вручную в разных конформациях.

Ранее в работе (Ozols, 1989) в экспериментах по обработке карбоксипептидазой Y однослойных липосом со встроенным b5 было показано, что 6 аминокислотных остатков (128-133) мембраносвязанного домена цитохрома b5 оказываются внутри липосомы. Другими авторами показано, что после действия протеаз фрагмент 103-127 остается в мембране (Tajima, 1980). В работе (Vergeres, 1995) был выделен гидрофобный фрагмент, содержащий 22 незаряженных аминокислотных остатка (104-126). На основе этих экспериментальных данных мембраносвязанный домен был условно разделен на три участка: соединительный участок (Ser89-Asp103), мембраносвязанный участок (Ser104-Tyr126) и С-концевой (His127-Asn133) (рис. 7).

На первом этапе конструирования мембраносвязанного домена была предсказана его вторичная структура. Мембраносвязанный участок b5 был определен всеми программами как α -спираль, С-концевой и соединительный – неупорядоченные участки.

Топология соединительного участка относительно водорастворимого домена неизвестна, но считается, что он является очень подвижным участком в белке (Clarke, 2004). Анализ области соединения водорастворимого и трансмембранного домена показал, что возможно множество конформаций соединительного участка. Для моделирования нами были выбраны две крайние возможные конформации этого участка.

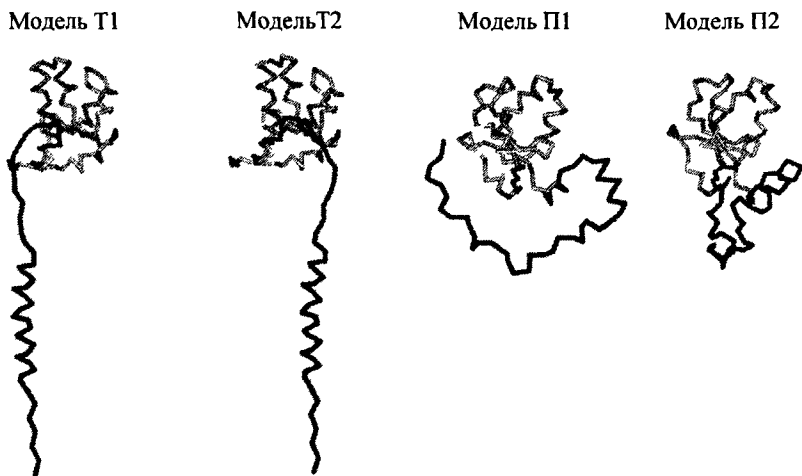


Рисунок 8. Предварительные модели пространственной структуры цитохрома b5 в Т-топологии (модели Т1 и Т2) и П-топологии (модели П1 и П2).

Светлым показаны водо-растворимые домены, темным - мембраносвязанные домены.

Моделирование МД цитохрома b5 в трансмембранной топологии.

Моделирование цитохрома b5 в Т-топологии происходило в два этапа. На первом этапе была получена модель бислоя со сквозным отверстием для размещения трансмембранного домена цитохрома b5. На втором этапе в оптимизированный для Т-топологии липидный бислой вставляли предварительно сконструированные модели цитохрома b5. Ранее было показано, что триптофановые остатки 108, 109 и 112 находятся в области углеродов 21-24 ацильных цепей липидов (нумерация атомов на рис. 1) (Markello, 1984). В трансмембранной топологии водорастворимый домен располагался таким образом, что он не участвовал во взаимодействии с головками бислоя. После добавления воды полученные системы использовали для дальнейшего моделирования.

Моделирование МД с обеими моделями цитохрома b5 в Т-топологии проводилось в течение 3,0 нс. Для модели Т1 равновесие по энергии было достигнуто через 0,2 нс моделирования МД, среднее значение потенциальной энергии составило $-1,31 \times 10^6$ кДж/моль. Однако стационарного состояния по величине RMS система достигла только через 1 нс (рис. 9). Для модели Т2 равновесие по энергии было достигнуто через 0,3 нс моделирования МД (среднее значение потенциальной энергии составило $-1,28 \times 10^6$ кДж/моль), а по величине RMS через 1,5 нс (рис. 9).



Рисунок 9.
Изменение величин RMS основных цепей модели T1 (черный) и T2 (серый).

Гем в стартовых моделях располагался приблизительно под углом 90° к плоскости поверхности бислоя. После моделирования МД в течение 1,3 нс системы с моделью T1, гем занял положение под углом приблизительно 45° к поверхности бислоя и данное положение оставалось постоянным до конца моделирования. Тот же угол 45° между плоскостями гема и мембраны был получен после 0,9 нс моделирования МД в системе, с моделью T2. Ранее было показано, что угол 45° является оптимальным для передачи электронов от цитохрома b5 к его редокс-партнерам (Yeung, 1999).

В течение всего моделирования МД конформация водорастворимого домена оставалась стабильной в обеих системах (рис. 10), а мембраносвязанный домен был перпендикулярным к поверхности бислоя. Таким образом, в течение моделирования изменялась конформация соединительного участка, что обуславливало изменение угла наклона водорастворимого домена в плоскости, параллельной гему. Наиболее стабильной была модель T1 (RMS равнялось 1,3 и 1,9 А для моделей T1 и T2, соответственно). Основные изменения в конформации мембраносвязанного домена в обеих моделях наблюдались в первые 1,0 нс моделирования МД и в дальнейшем обе системы оставались стабильными.

В начале динамики в обеих моделях происходило нарушение структуры α -спирали в центре (Trp109 – Leu113). Основные различия в поведении мембраносвязывающего участка в двух анализируемых моделях наблюдались в области α -спирали, расположенной ближе к водорастворимому домену. Если в модели T1 неупорядоченный участок составил 3 аминокислотных остатка, то в модели T2 неупорядоченный участок был более протяженным и составил 8 аминокислотных остатков.

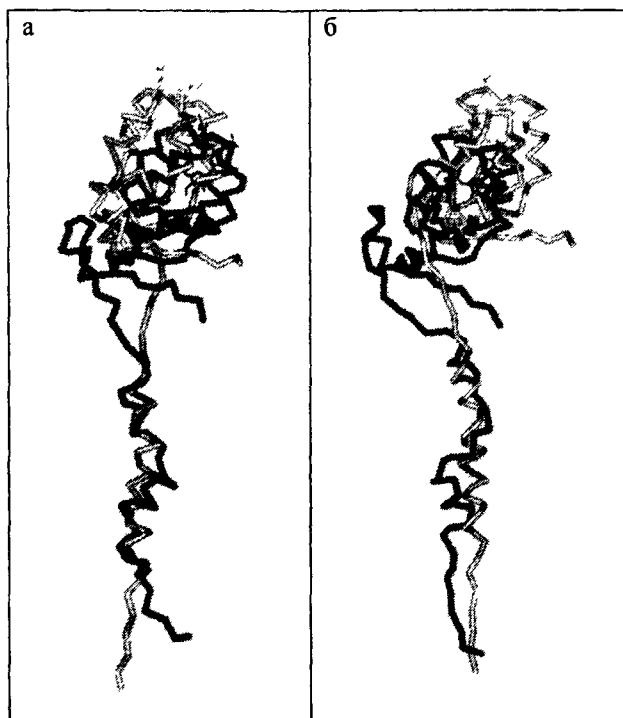
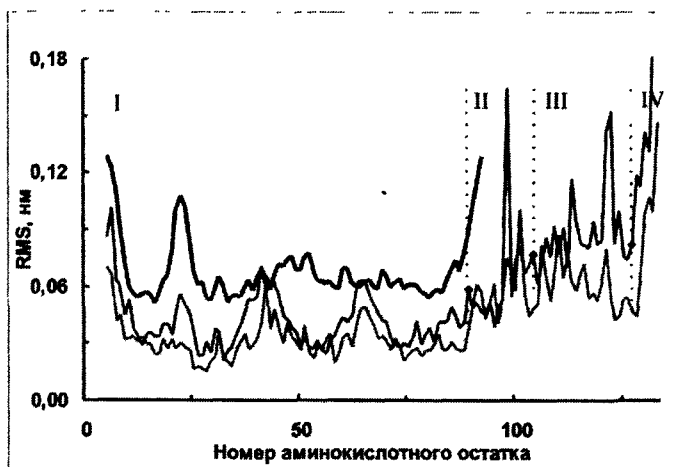


Рисунок 10. Пространственное совмещение основных цепей начальной структуры в Т-топологии (светлый цвет) и после моделирования МД системы бислой/белок/вода в течение 3,0 нс (темный цвет). Совмещено по мембраносвязанному домену.
а – модель Т1,
б – модель Т2.

Сопоставление среднеквадратичного отклонения аминокислотных остатков в процессе моделирования МД с вычисленным из В-фактора кристаллической структуры цитохрома b5 показано на рис. 11а. RMS из моделирования МД хорошо согласуется с RMS кристаллической структуры цитохрома b5. В обоих моделях наиболее подвижными участками являются N- и С-концы белка. Кроме того, в области водорастворимого домена наблюдаются два пика: остатки 40-46, 62-70 (рис. 11). Считается, что повышенная подвижность этих участков белка имеет физиологическое значение и связана со значительными структурными перестройками в глобулярной части цитохрома b5 при взаимодействии с партнерами и передаче электронов (Mathews, 1972).

В модели Т1 наблюдался дополнительный пик RMS в области остатков 19-25, который также виден и в кристаллической структуре. Отсутствие пика на графике для модели Т2 обусловлено тем, что в ней эта область стабилизирована взаимодействием с соединительным участком Ser89–Asp103. Поскольку кристаллическая структура содержит только водорастворимый домен, то область остатков 19-25 у него является подвижной.

а



б



в



Рисунок 11. Среднеквадратичное отклонение аминокислотных остатков (RMS), рассчитанное из кристаллической структуры (черный цвет) и моделей T1 (синий цвет) и T2 (зеленый цвет) в моделировании МД в промежутке 1,0-2,5 нс (а) и наиболее подвижные области в водорастворимом домене в T1 (б) и в T2 (в): Leu40 - Gly46 (красный), Phe62 - Asp70 (желтый) и His19 - Thr25 (оранжевый).

I - водорастворимый домен, II - соединительный участок, III - мембраносвязанный участок, IV - С-концевой участок.

На рис. 12 показана площадь поверхности аминокислотных остатков цитохрома b5, доступной для липидов. Видно, что точка действия трипсина, разделяющего b5 на водорастворимый и мембраносвязанный домены (Asp103) (Tajima, 1980; Ozols, 1989), доступна для воды в обеих моделях.

Для оценки стабильности мембраносвязанного домена в трансмембранной топологии был выполнен контрольный эксперимент по моделированию МД модели T1 вне бислоя (в водном окружении) в течение 1,0 нс. Уже после 0,3 нс моделирования МД топология мембраносвязанного участка белка нарушилась - произошел излом мембраносвязанного участка в области Pro115. Такое поведение мембранного участка цитохрома b5 согласуется поведением в аналогичном эксперименте MAO A, белка с известной трансмембранной топологией мембранного якоря.

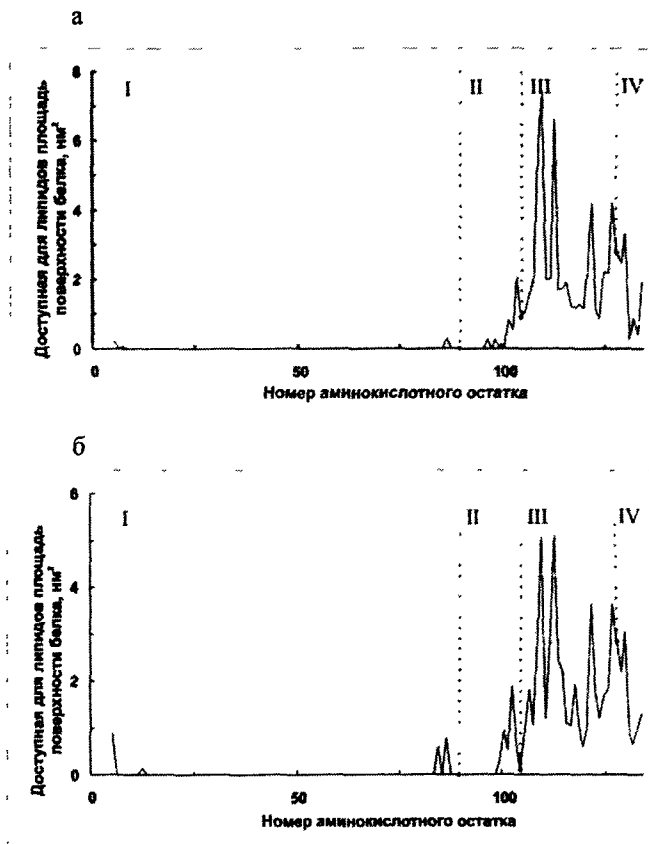


Рисунок 12. Доступная для липидов площадь поверхности моделей T1(а) и T2(б) после моделирования МД в течение 2,5 нс.

Моделирование МД цитохрома b5 в петлевой топологии.

Моделирование цитохрома b5 в петлевой топологии, как и в трансмембранной, происходило в два этапа. На первом этапе была модифицирована модель бислоя, в котором из одного монослоя были удалены 23 молекулы ДПФХ для освобождения места под цитохром b5 в петлевой топологии. В результате этот монослой содержал 146 молекул ДПФХ. На втором этапе в подготовленный липидный бислой вставляли предварительно сконструированные модели цитохрома b5 в П-топологии.

Степень погружения в бислой моделей в П-топологии соответствовала экспериментальным данным по флуоресценции триптофановых остатков и области действия протеаз (Markello, 1985; Ozols, 1989; Tajima, 1980). После добавления воды полученные системы использовали для дальнейшего моделирования.

Моделирование МД цитохрома b5 в П-топологии проводилось в течение 3,0 нс. Модель П1 достигла стационарного состояния по энергии через 0,25 нс моделирования МД, среднее значение потенциальной энергии составило $-1,20 \times 10^6$ кДж/моль. Для модели П2 стационарное состояние было достигнуто еще быстрее (через 0,2 нс) и среднее значение потенциальной энергии было немного ниже ($-1,22 \times 10^6$ кДж/моль). Однако стационарного состояния по величине RMS для модели П1 в течение 3,0 нс моделирования МД достигнуто не было, в то время как для модели П2 стационарное состояние было достигнуто через 1,5 нс (рис. 13).

В течение всего моделирования конформация водорастворимого домена в обеих моделях оставалась стабильной. Модели отличались тем, что в модели П2 наблюдалось сближение мембраносвязанного и водорастворимого доменов, в то время как у модели П1 возникал дефект бислоя в области взаимодействия с белком.



Рисунок 13. Изменение величин RMS основных цепей моделей П1 (черный) и П2 (серый).

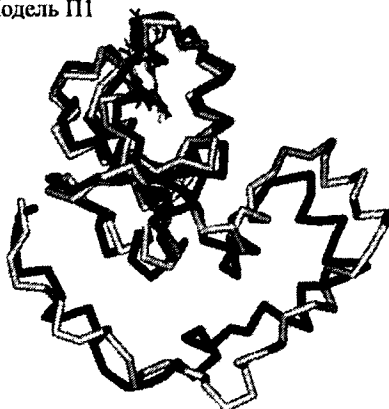
В начальных конформациях гем располагался под углом 60° к плоскости мембраны. При моделировании МД происходило медленное изменение положения гема в разных направлениях. В результате угол между плоскостью гема и плоскостью мембраны составил примерно 90° для модели П1 и 45° для модели П2.

Модель П2 оказалась более стабильной ($RMS = 1,5 \text{ \AA}$) по сравнению с П1 ($RMS = 2,5 \text{ \AA}$). Основные изменения в конформации мембраносвязанного домена в обеих моделях наблюдались в первые 0,3 нс моделирования МД. При этом изменения вторичной структуры мембраносвязанного домена не наблюдались (рис. 14).

Среднеквадратичное отклонение аминокислотных остатков цитохрома b5 в П-топологии при моделировании МД представлено на рис. 15. Наиболее подвижными участками в обеих моделях являются N и C-концы. В водорастворимом домене модели П2 наблюдались два небольших пика (остатки 40-46, 63-68) в той же области, что и в моделях Т-топологии.

На рис. 16 показано распределение доступной для липидов площади поверхности моделей в бислое. Видно, что известные из литературы области действия протеаз (аминокислотные остатки 103 и 127) (Tajima, 1980; Ozols, 1989), доступны для воды в обеих моделях. В модели П2 наблюдалось существенное взаимодействие водорастворимого домена белка с бислоем (аминокислотные остатки 9-24, 48-56, 84-88).

Модель П1



Модель П2

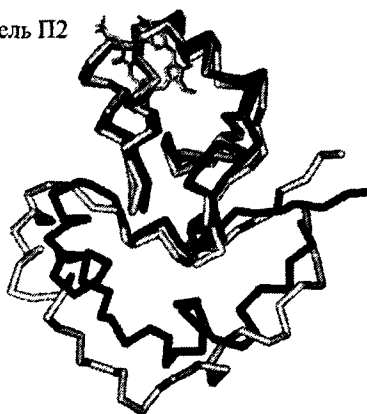


Рисунок 14. Пространственное совмещение основных цепей стартовой (светло-серый) и после моделирования МД в течение 3,0 нс (темно-серый) моделей П1 и П2. Совмещение выполнено по водорастворимому домену.

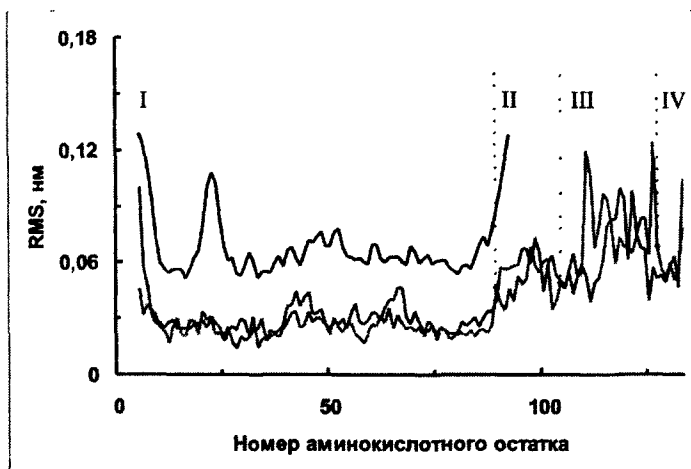


Рисунок 15. Среднеквадратичное отклонение аминокислотных остатков (RMS), рассчитанные из кристаллической структуры (черный) и моделей П1 (зеленый) и П2 (синий) при моделировании МД в промежутке 1,0-2,5 нс. I - водорастворимый домен, II – соединительный участок, III – мембраносвязанный участок, IV – С-концевой участок.

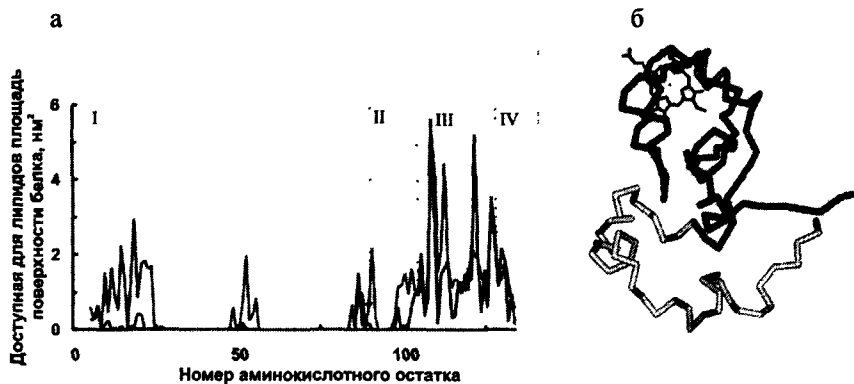


Рисунок 16. Доступная для липидов площадь поверхности моделей П1 (синий) и П2 (зеленый) цитохрома b5 после моделирования МД в течение 2,5 нс (а) и участки водорастворимого домена в модели П2, взаимодействующие с бислоем (голубым цветом) (б). Водорастворимый домен показан темным, мембраносвязанный – светлым цветом.

Сопоставление характеристик моделей П1 и П2 цитохрома b5 позволяет сделать заключение, что структура белка в модели П2 более взаимосогласована и, по-видимому, более точно отражает структуру цитохрома b5 в П-топологии.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

Основные характеристики исследованных моделей полноразмерного цитохрома b5 в мембранном окружении представлены в таблице 2. Сопоставление параметров моделей П1 и П2 показывает, что модель П2 обладает лучшими характеристиками по сравнению с П1. Этот вывод подтверждается также тем, что в процессе моделирования МД в модели П2 происходит сближение водорастворимого и мембраносвязанного доменов, в результате чего практически исчезает пустое пространство между доменами и ряд аминокислотных остатков водорастворимого домена контактирует с полярными головками липидов. Подобный эффект сближения водорастворимого и мембраносвязанного доменов наблюдался ранее при моделировании цитохрома b5 в П-топологии в системе бензол/вода (Иванов, 2000). Модель П2 является также более стабильной, чем модель П1 исходя из значений потенциальной энергии и RMS. Негативным фактором является влияние положения мембраносвязанного домена в модели П1 (С-концевая область) на подвижность участков в водорастворимом домене (Leu40 – Gly46, Phe62 – Asp70, His19 – Thr25), важных для формирования комплексов с редокс-партнерами и переноса электронов. Все эти данные указывают на то, что модель П2 лучше соответствует структуре цитохрома b5 в петлевой конформации мембранного домена.

Сопоставление расчетных параметров моделей Т1 и Т2 показывает, что модель Т1 более устойчива. Это выражается в меньших величинах потенциальной энергии системы и RMS белка при моделировании МД, а также в более быстром достижении стационарного состояния по RMS. Кроме того, в модели Т1 мембраносвязанный участок остается более структурированным, чем в модели Т2. Таким образом, эти данные указывают, что модель Т1 более точно отражает структуру цитохрома b5 в бислой в трансмембранной топологии.

Изучение процесса встраивания цитохрома b5 в клеточные мембраны показало, что этот процесс происходит посттрансляционно (Vergeres, 1995), не связан с SRP-частицами (Vergeres, Waskell, 1995) и не является АТФ-зависимым (High, Abell, 2004). Исследования с использованием специфических антител и цитохрома b5, связанного с тагом гликозилирования (глик-b5), показали, что в мембране этот белок присутствует в основном в трансмембранной конформации (Honsho, 1998; Hanlon, 2000). В одной из работ было показано, что при введении глик-b5 в клетку, обнаруживались оба варианта топологии белка: часть белка находилась в Т-топологии, часть белка в П-топологии. Через некоторое

Таблица 2. Основные характеристики моделей цитохрома b5.

Параметр	Модель П1	Модель П2	Модель Т1	Модель Т2
Средняя потенциальная энергия, кДж/моль, $\times 10^6$	-1,20	-1,22	-1,31	-1,28
Угол между гемом и бислоем, град.	60 (t=0 нс) 90 (t=3,0 нс)	60 (t=0 нс) 45 (t=3,0 нс)	90 (t=0 нс) 45 (t=3,0 нс)	90 (t=0 нс) 45 (t=3,0 нс)
Пространственное выравнивание основных цепей стартовой модели и модели после 3,0 нс моделирования МД (RMS), Å	2,5	1,5	1,3	1,9
Области подвижных остатков водорастворимого домена	нет	Leu40 – Gly46, Glu63 – Ser68	Leu40 – Gly46, Phe62 – Asp70, His19 – Thr25	Leu40 – Gly46, Phe62 – Asp70
Изменения структуры мембраносвязанного домена и бислоя	Дефект бислоя	Структуры согласованы	2 α -спирали, разрыв – 3 остатка	2 α -спирали, разрыв – 8 остатков.
Взаимодействие участка His19 – Thr25 с бислоем или белком	с С-концом белка	с бислоем	—	с соединительным участком белка
Расстояние между C α -атомами Ser22 и Ala54, нм	0,95	1,22	1,13	1,02
Доступность протеазам (Asp103, His127)	есть	есть	есть	есть
Взаимодействие водорастворимого домена с бислоем	—	Lys9 – Ser24, Glu48 – Gly56, His84 – Arg88	—	His84, Asp86

время практически весь белок переходил в Т-топологию, при этом авторы не регистрировали перехода цитохрома b5 из Т- в П-топологию (Honsho, 1998). Эти экспериментальные данные указывают на то, что Т-топология мембранного участка цитохрома b5, по видимому, является физиологической формой этого белка в клеточных мембранах, а конформация белка в П-топологии может присутствовать только как временная форма в процессе встраивания цитохрома b5 в мембрану. Противоречивые данные о топологии мембраносвязанного домена могут быть обусловлены также разными

временами регистрации. В равновесной системе цитохром b5 находился в Т-топологии, тогда как в короткие времена после введения белка, регистрировался цитохром b5 в П-топологии. В наших контрольных исследованиях при моделировании цитохрома b5 в Т-топологии в воде происходил излом мембранного якоря в районе Pro 115, что свидетельствует о том, что цитохром b5 может находиться в топологии, близкой к петлевой при встраивании в бислой из водной фазы.

Переход топологии мембраносвязанного домена из петлевой в трансмембранную возможен при переходе амидной связи Pe114 – Pro115 из цис- в транс- положение. Энергетически невыгодно нахождение пролинового остатка в цис-положении (Richardson, 1981; Abeles, 1992; Vergeres, Waskell, 1995).

В Т-топологии наиболее стабильной является модель T1, основное различие моделей T1 и T2 заключается в разной конформации соединительного участка (Ser89 - Asp103). В модели T2 он взаимодействует с петлей His 19 – Thr 25, тогда как в модели T1 этот участок расположен свободно. Таким образом, конформация соединительного участка относительно водорастворимого домена может оказывать влияние как на структуру и стабильность мембраносвязанного участка, так и на функцию белка.

Для оценки роли связывающего участка были проанализированы изменения в водорастворимом домене в обеих моделях, а также проанализированы районы потенциального взаимодействия b5 с редокс-партнерами. В настоящее время считается, что перенос электронов возможен по двум путям (рис. 17) (Storch, Daggett, 1995; Hom, 2000). Согласно первому из них, при переносе электронов гемы цитохрома b5 и редокс-партнеров располагаются в одной плоскости, и во взаимодействие вовлекаются аминокислотные остатки спиралей $\alpha 3$, $\alpha 4$ и петли между ними (Glu44, Glu48, Asp 60) (Rodgers, 1988) (рис. 17a). Согласно второму варианту пути переноса электронов, гемы редокс партнеров и цитохрома b5 располагаются перпендикулярно друг другу, при этом функционально важное значение имеет петля $\alpha 1$ - $\beta 2$ (аминокислотные остатки His 19 – Thr 25), которая, изменяя конформацию, регулирует доступ к гему (Hom, 2000; Storch, Daggett, 1995) (рис. 17б). В настоящее время есть экспериментальные данные, подтверждающие возможность существования обоих путей передачи электронов (Storch, Daggett, 1995; Hom, 2000). Анализ подвижности аминокислотных остатков в ходе моделирования МД показал, что наблюдается повышенная подвижность участков, связанных с обоими путями переноса электронов (в модели T1 Leu 40 – Gly 46, Phe 62 – Asp 70, His 19 – Thr 25).

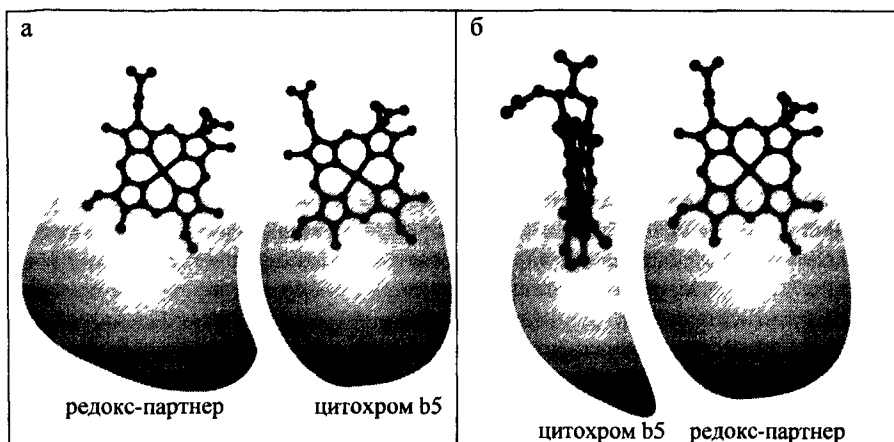


Рисунок 17. Возможные варианты ориетации гемов цитохрома b5 и его редокс-партнеров.

а – положением гемов редокс-партнеров в одной плоскости,

б – положением гемов редокс-партнеров перпендикулярно друг другу.

В работе других авторов по моделированию взаимодействия цитохрома b5 с цитохромом С (Ном et al., 2000) методом ручного докинга с последующей МД было показано, что стабильные комплексы могут сформироваться для обоих путей передачи электронов. Комплекс между цитохромами b5 и С с расположением гемов в одной плоскости характеризовался небольшой площадью контакта, но близким расположением атомов железа гемов (15-17 Å). В комплексе цитохром b5-цитохром С для переноса электронов при перпендикулярном положении гемов расстояние между атомами железа гемов было большим (21 Å), но площадь контакта белков была больше, что предполагает формирование более долгоживущего комплекса. В наших модельных экспериментах на возможность формирования комплекса цитохрома b5 со своими редокс-партнерами указывает анализ липофильного потенциала поверхности моделей цитохрома b5 (рис. 18). Видно, что в модели T1 имеются две выраженных гидрофобных области. Первая область имеет небольшой размер и образована частичным открыванием петли α 1- β 2, вторая область сформирована гидрофобными остатками водорастворимого домена и соединительного участка мембраносвязывающего домена. Обе эти области располагаются в районах образования комплекса цитохрома b5 с его редокс-партнерами. В модели T2 такие области отсутствуют.

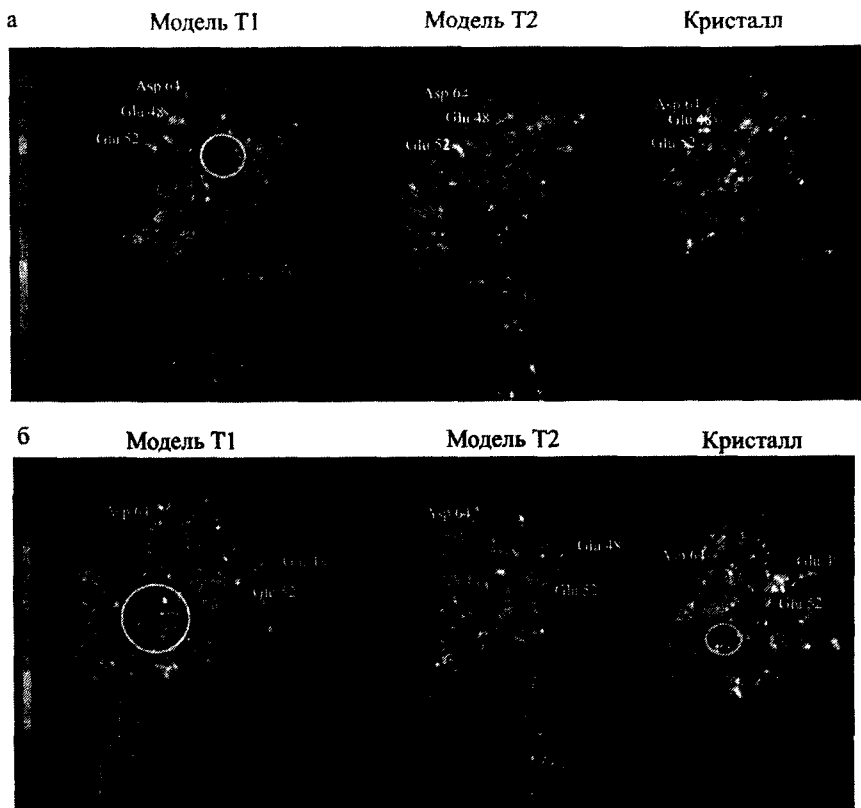


Рисунок 18. Поверхности моделей T1, T2 и кристаллической структуры водорастворимого домена цитохрома b5, раскрашенные по величине липофильного потенциала (LP). Максимальные значения LP – коричневый цвет, минимальное – синий. Выделены остатки, которые являются важными для передачи электронов, желтым выделены гидрофобные области.

а – путь переноса электронов с перпендикулярным положением гемов редокс партнеров,
 б – путь переноса электронов с положением гемов редокс партнеров в одной плоскости.

Вышеперечисленные данные указывают на то, что в реальных условиях соединительный домен может выполнять регуляторную роль, участвуя в образовании контакта между цитохромом b5 и его редокс партнерами. На наличие у цитохрома b5 двух мест связывания с другими белками также указывают экспериментальные данные, полученные при титровании цитохрома b5 цитохромом С (Ном, 2000). Наблюдалось

стехиометрия цитохром b5 : цитохром c = 1 : 2. Так же было зарегистрировано образование тройного комплекса флавопротеин – цитохром P450 2B4 – цитохром b5 (Kuznetsov, 2004).

ВЫВОДЫ

1. Построена компьютерная модель среды для моделирования периферических мембранных белков, состоящая из липидного бислоя и двух водных фаз. На примере мембранного белка моноаминоксидазы А с известной пространственной структурой и мембранной топологией показано, что данная среда может быть использована для моделирования мембранных белков.
2. Построены модели цитохрома b5 в трансмембранной и петлевой топологиях. Моделирование молекулярной динамики показало стабильность обоих вариантов, что предполагает возможное существование b5 в двух топологиях и объясняет существующие противоречивые экспериментальные данные.
3. Анализ построенных моделей цитохрома b5 показал, что конформация участка Ser89–Asp103, соединяющего водорастворимый и мембраносвязанный домены, может играть важную роль в регуляции взаимодействия цитохрома b5 с его редокс-партнерами.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. A.S. Ivanov, V. Skvortsov, A. Sechenykh, Y. Smolinskaya, A. Archakov. Trends and new perspectives in 3D modeling of cytochrome P450. // 2th International conference “Genomics, Proteomics and Bioinformatics for Medicine”, Moscow-Ples-Moscow, 2004, 3.2.
2. Ю.Ю. Смолинская, А.В. Веселовский, А.С. Иванов. Моделирование структуры моноаминоксидазы А в мембранном окружении. // Тезисы XII Российского Национального Конгресса “Человек и лекарство”, Москва, 2005,
3. Ю.Ю. Смолинская, А.В. Веселовский, А.С. Иванов Полноатомная компьютерная модель бислойной мембраны из дипальмитоилфосфатидилхолина. // Тезисы 4-ой Национальной конференции “Информационно-вычислительные технологии в решении фундаментальных научных проблем и прикладных задач химии, биологии, фармацевтики, медицины”, Москва, 2005.
4. А.С. Иванов, В.С. Скворцов, А.А. Сеченых, Ю.Ю. Смолинская, А.И. Арчаков. Проблемы и перспективы моделирования трехмерных структур цитохромов P450. // Тезисы 4-ой Всероссийской конференции “Молекулярное моделирование”, Москва, 2005, 29.
5. A.S. Ivanov, Y.Y. Smolinskaya, A.I. Archakov Computer simulation of full-length cytochrome b5 in explicit lipid bilayer. // 14th International Conference on Cytochromes P450: Biochemistry, Biophysics and Bioinformatics, Dallas, USA, 2005.

6. Ю.Ю. Смолинская, А.В. Веселовский, А.С. Иванов Полноатомная компьютерная модель бислойной мембраны с МАО А. // Биомедицинская химия, 2004, 50, 451-459.

РНБ Русский фонд

2007-4

6699

09 КИС: 2005