

ЛИПИД-ОПОСРЕДОВАННАЯ АДАПТАЦИЯ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ В КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАНАХ

© 2024 г. А. А. Полянский^a, Р. Г. Ефремов^{a, b, c, *}

^aИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

^bНациональный исследовательский университет Высшая школа экономики, Москва, 101000 Россия

^cМосковский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный, 141701 Россия

*e-mail: r-efremov@yandex.ru

Поступила в редакцию 6.06.2024

После доработки 30.06.2024

Принята к публикации 02.07.2024

Представлены результаты исследований в компьютерном эксперименте молекулярных механизмов адаптации модельных клеточных мембран, реализующейся в ходе их взаимодействия с белками и пептидами. Речь идет об изменении структурно-динамических параметров водно-липидной среды, гидрофобной/гидрофильной организации поверхности липидного бислоя (так называемой «мозаичности») и пр. Взятые в совокупности, эти эффекты получили название «мембранного ответа» (МО) — важнейшей способности клеточных мембран специфично и устойчиво реагировать на встраивание и функционирование в них внешних агентов, в первую очередь — белков и пептидов. Описаны полученные в ходе многолетних исследований результаты авторов в области молекулярного моделирования процессов МО с различными пространственно-временными характеристиками — от эффектов связывания с белками отдельных молекул липидов до изменения интегральных макроскопических параметров мембран. Основная часть результатов получена с использованием разработанной авторами технологии «динамического молекулярного портрета». Обсуждаются биологическая роль наблюдаемых явлений и возможные пути рационального проектирования искусственных мембранных систем с заданными характеристиками МО. Это, в свою очередь, важно для направленного изменения профиля активности белков и пептидов, действующих на биомембраны, в том числе в качестве перспективных фармакологических агентов.

Ключевые слова: мембранные белки, молекулярно-биофизическая платформа, компьютерное моделирование, молекулярная динамика, «мембранный ответ», белок-липидные взаимодействия.

Сокращения: АМП — антимикробный пептид; гНК — гидрофобный нанокластер; ДМП — динамический молекулярный портрет; ДМФХ — димиристоилфосфатидилхолин; ДПФХ — дипальмитоилфосфатидилхолин; ДОФГ — диолеилфосфатидилглицерин; ДОФС — диолеилфосфатидилсерин; ДОФЭ — диолеилфосфатидилэтаноламин; ДЭФХ — диэйкозеноилфосфохолин; МАП — мембраноактивный пептид; МБ — мембранный белок; МГП — молекулярный гидрофобный потенциал; МД — молекулярная динамика; МО — мембранный ответ; НК — нанокластер; ПОФХ — пальмитоилолеилфосфатидилхолин; ПОФЭ — пальмитоилолеилфосфатидилэтаноламин; ТМ — трансмембранный; ТМД — трансмембранный домен; ФГ — фосфатидилглицерин; ФЭ — фосфатидилэтаноламин; D_{phob} — толщина гидрофобного слоя мембраны; Н-связь — водородная связь; EGFR — рецептор эпидермального фактора роста (Epidermal growth factor receptor); GpA — гликофорин-A (Glycophorin A); PDGFRb — рецептор тромбоцитарного фактора роста b (Platelet-derived growth factor receptor b).

DOI: 10.31857/S0233475524050093, EDN: cbfpad

1. ВВЕДЕНИЕ

В юбилейном выпуске журнала «Биологические мембраны», посвященном 40-летию его основания, а также 90-летней годовщине со дня рождения

учредителя издания академика Юрия Анатольевича Овчинникова, мы хотим затронуть одну из интереснейших и важнейших (на наш взгляд) тем биофизики клеточных мембран. Речь идет о молекулярных механизмах так называемого «мембранного

ответа» (МО), а именно о способности биомембран очень эффективно реагировать на разнообразные «внешние вызовы», такие как меняющиеся условия среды, встраивание сторонних молекул — белков, пептидов, низкомолекулярных соединений и т.д. Термином «эффективно» в данном случае мы обозначаем следующие характеристики: 1) скорость осуществления крупномасштабных (с линейными размерами > 1 нм) конформационных перестроек водно-липидных надмолекулярных систем — вплоть до времен $\sim$ нс; 2) устойчивость указанных процессов к помехам и флуктуациям (т.е. к ошибкам входных сигналов), неизменно присущих живым системам, и одновременно — высокую селективность реакции, достигаемую за счет способности тонкой регуляции структурно-динамических свойств мембранных систем; 3) стабильность — исключительную воспроизводимость МО в работе системы, наблюдаемую на протяжении всего жизненного цикла клетки.

Указанная выше способность мембран приспосабливаться (адаптироваться) к условиям клеточного окружения была ясна с самого начала изучения структуры и работы мембран на молекулярном уровне, хотя имевшаяся на тот момент необходимая информация была крайне ограниченной. В частности, мембранам уже изначально приписывали свойства эластичности, способности к деформации, текучесть, способность к локальным (кривизна и пр.) и глобальным (слияние) перестройкам и т.д. При этом, в отсутствие экспериментальных и расчетных данных с атомарным разрешением, подобные характеристики стремились учитывать на уровне интегральных макроскопических свойств мембран, например, в континуальных моделях. Таким образом, не было возможности принять во внимание сложную мозаичную природу мембран, характеризующуюся наличием в них динамических гетерогенностей различного пространственно-временного масштаба — от 1 нм до 10^3 нм и от 0.1 нс до миллисекунд.

На этом этапе исследований наиболее важной задачей являлось получение сведений о мембранных белках (МБ) — основных фармакологически ценных мишенях действия лекарств: рецепторах, ионных каналах, ферментах и др. Кроме того, акцент делали и на анализе свойств мембраноактивных пептидов (МАП) и белков, в частности, антимикробных пептидов (АМП), пептидов-переносчиков, пептидов слияния, ряда полипептидных токсинов (например, кардиотоксинов) и др. Понимание молекулярных механизмов действия указанных агентов на мембраны живой клетки дает возможность создания новых лекарств, в основе действия которых лежит изменение как

характеристик липидной фазы, так и взаимодействующих с ней белков/пептидов. Данный подход имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием низкомолекулярных лекарственных соединений. При этом мембранное окружение часто рассматривали лишь как инертную матрицу, обладающую центральным гидрофобным слоем и более полярными интерфейсами на границе с водой. Кроме того, как правило, считали, что мембрана в основном нужна для корректной адаптации трансмембранных (ТМ) доменов (ТМД) белков, либо их примембранных участков, обеспечивая сохранение их нативной структуры, задавая правильную мембранную топологию белка и давая ему возможность необходимым образом взаимодействовать с партнерами в клетке — другими белками, лигандами и пр.

Однако по мере стремительного накопления знаний о МБ, включая экспериментальные структурные данные высокого разрешения, стало ясно, что, помимо указанных выше трудностей и ограничений экспериментальных методов, понимание важнейших деталей структурной организации и, следовательно, механизмов работы МБ невозможно без детальной расшифровки вклада самой мембранной среды, которая очень чутко реагирует на присутствие МБ, МАП и других внешних агентов, меняя как свои собственные физико-химические свойства, так и характеристики взаимодействующих с ней молекулярных систем. В этом и заключается липид-опосредованная адаптация белков и пептидов в клеточных мембранах. В этой связи в рамках настоящего мини-обзора будут рассмотрены следующие темы: «море липидов» или «мозаичная» мембрана; факторы неоднородности липидного бислоя и возможности их изучения; ключевые модальности регуляции функции белков и пептидов, опосредованные мембраной; рациональный дизайн мембранных систем и терапевтических агентов. Поскольку МО — это пример самоорганизации белок-липидных систем, то характеристики взаимодействующих партнеров — водно-липидной среды и белка/пептида — будут рассматриваться в совокупности, причем на различных масштабах — как интегральные эффекты, локальные (микроскопические) характеристики, одиночные молекулы липидов. Представленный материал не претендует на роль классического обзора, поскольку авторы не ставили своей задачей во всех необходимых в таких случаях деталях изложить состояние проблемы и дать исчерпывающую информацию из литературных источников. Скорее, это очерк, в котором изложено понимание авторами базовых принципов эффектов МО и его роли в функционировании клетки

на основании полученного опыта исследований указанных явлений.

2. «МОРЕ ЛИПИДОВ» ИЛИ «МОЗАИЧНАЯ» МЕМБРАНА

Кроме роли гидрофобного барьера, отделяющего содержимое клеток и/или клеточных оргanelл от внешней среды, липидный бислой биологических мембран активно участвует во многих биохимических процессах в живых организмах. До 80% массы клеточных мембран составляют белки, углеводы, стероиды и другие нелипидные компоненты, которые определяют специфичность и широкий спектр биологической активности мембран: молекулярный и ионный транспорт, клеточную сигнализацию и коммуникацию, деление и слияние мембран и т.д. [1]. Важно отметить, что для бесперебойной работы клетки требуется надежное функционирование в течение жизненного цикла клетки таких сложных супрамолекулярных ансамблей, какими являются биомембраны, — они должны быстро и адекватно отвечать на внешние/внутренние сигналы и патологические угрозы [2, 3]. Тонкие молекулярные детали этого удивительного по своей отлаженности и устойчивости к флуктуациям механизма работы клеточных мембран еще далеки от понимания, хотя уже ясно, что мембранные липиды представляют собой очень важный элемент «головоломки». В отличие от ранних представлений мембран в виде некой инертной среды с полярными поверхностями и гидрофобным ядром, в котором различные белки и другие молекулы могут осуществлять свои функции, многокомпонентные липидные бислои клеточных мембран представляют собой динамичную, четко организованную, высокоактивную и тонко настраиваемую среду [4].

Согласно современным представлениям, сформировавшимся на основании большого набора экспериментальных и расчетных данных, указанные аспекты функционирования клеточных мембран во многом обусловлены неоднородностью характеристик их липидного «остова», проявляющейся на различных пространственно-временных масштабах. Это фундаментальное свойство биомембран, которое требует тщательного изучения.

Установлено, что гетерогенные свойства липидных мембран определяются физической и химической природой составляющих их молекул, в первую очередь — амфифильных липидов, а также их многообразием — помимо белков, природные мембраны содержат сотни типов липидов и других соединений. Даже сравнительно небольшие отличия в полярных головках и/или ацильных

цепях молекул липидов приводят к неидеальному смешиванию липидов в бислоях за счет различий в картине межмолекулярных взаимодействий, реализующихся в системе [5, 6].

Под термином «гетерогенная природа клеточных мембран» часто понимают их «слоистую» структуру — чередующиеся вдоль направления нормали к плоскости липидного бислоя параллельные слои с сильно отличающимися физико-химическими свойствами (рис. 1а). Именно такая организация биомембран создает надежный барьер, защищающий содержимое клетки от внешней среды, обеспечивает правильное встраивание, сворачивание и работу многочисленных МБ, МАП и других молекул. Однако не менее важна и картина латерального распределения свойств липидных бислоев. Установлено, что они также неоднородны по ряду ключевых параметров: плотности компонентов мембраны (липидов, воды, малых молекул, ионов и др.), распределению гидрофобных и электрических свойств и т.д. Наиболее значимыми среди этих областей (слоев) являются границы раздела мембрана—вода. Особенности организации этих поверхностей критически важны для распознавания клеточных мембран и моделирующих их миметиков внешними агентами — белками, пептидами и их комплексами, включая вирусы и др.

Отметим, что паттерны латеральных неоднородностей меняются во времени, в том числе и в состояниях равновесия или квазиравновесия (насколько о них вообще можно говорить в живой клетке). При этом пространственно-временные масштабы неоднородностей (доменов, кластеров) варьируют в широком диапазоне — от 1 нм до 10^3 нм и от 0.1 нс до миллисекунд (см. ниже). Каковы свойства границы раздела мембрана—вода, которые проявляют неоднородность их латерального распределения? Наиболее важными являются: (1) структурные характеристики, выраженные в терминах плотности молекул и отдельных атомов, а также описывающие рельеф молекулярной поверхности липидного бислоя; (2) распределение гидрофобных/гидрофильных и/или электрических свойств на поверхности мембраны; (3) динамические параметры компонентов мембраны, обусловленные их конформационными изменениями и латеральной диффузией в различных пространственных масштабах — от интегральных макроскопических средних величин до траекторий отдельных молекул и входящих в них групп.

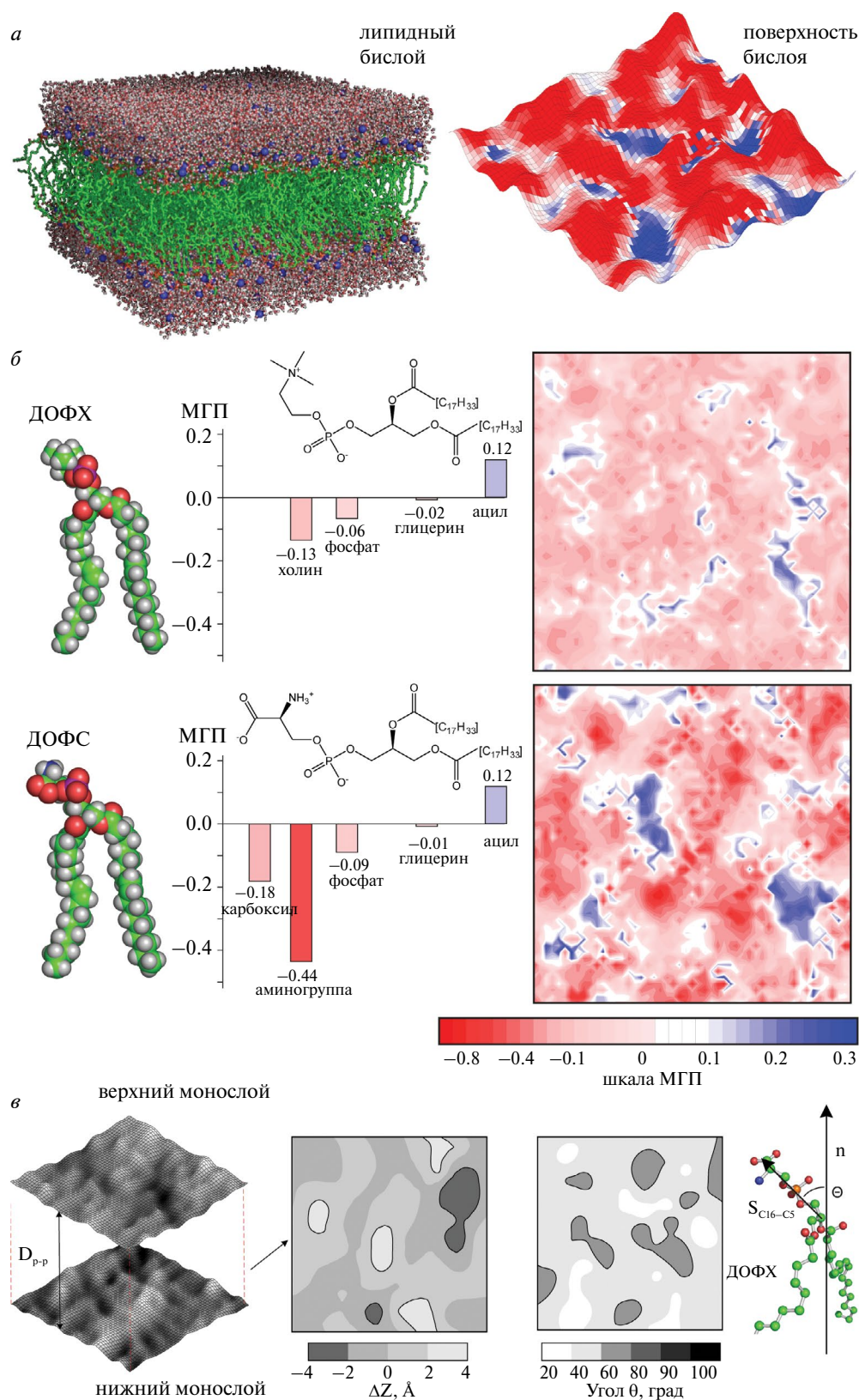


Рис. 1. Неоднородная организация липидного бислоя. *а* – Полноатомная структура липидного бислоя и поверхность бислоя, окрашенная по МГП (см. далее). *б* – Двумерные карты поверхности бислоев ДОФХ и ДОФС, окрашенные в соответствии со значениями МГП (красным и синим цветом показаны гидрофильные и гидрофобные участки поверхности). Полноатомные модели структур бислоев получены в расчетах МД. Подробнее см. [24]. *в* – Картирование ландшафта бислоя и угла наклона полярных головок по отношению к нормали к плоскости бислоя.

3. ФАКТОРЫ НЕОДНОРОДНОСТИ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИЗУЧЕНИЯ

Структурно-динамические параметры липидных молекул в области связывания периферических МАП с мембраной, а также в окрестности ТМД отличаются от невозмущенного бислоя. В данной работе отклонение от такого невозмущенного состояния определено как феномен МО. В частности, вследствие МО наблюдается изменение параметров липидного бислоя, которое приводит к возникновению различного характера неоднородностей как вдоль нормали к мембране, так и латеральных. Природа различных неоднородностей в липидной мембране, а также возможности их изучения в компьютерном эксперименте рассмотрены в данном разделе.

3.1. Липидный состав

Клеточные мембраны отличаются многообразием компонентов липидной фракции, при этом для каждого типа мембраны характерен определенный липидный состав, связанный с ее функцией. Например, многокомпонентные мембраны эукариотических клеток имеют в своем составе холестерин, что отличает их от мембран бактерий. В плазматической мембране клеток млекопитающих содержание холестерина достигает 30–40%, что превышает значения для других компонентов [7]. Такая высокая концентрация холестерина в мембране приводит к возможности формирования особой жидко-упорядоченной фазы в липидном бислое и возникновению липидных доменов — от нанокластеров (НК) до липидных «рафтов» [8]. Структурно-динамические свойства жидко-упорядоченной фазы (например, толщина гидрофобного слоя — D_{phob} , сравнимая с таковой для гелевой фазы, и высокая скорость диффузии как в жидко-неупорядоченной фазе) определяют предпочтительную локализацию различных МБ и формирование функционально обособленных «рафтовых» областей клеточной мембраны. Такие МБ могут иметь повышенное сродство к холестерину вследствие наличия специфических сайтов на поверхности [9]. Таким образом, локальная концентрация и изменение этого параметра в результате МО будут влиять на функцию и локализацию МБ.

В свою очередь, отличительной особенностью бактериальных мембран является повышенное содержание фосфатидилглицерина (ФГ). Например, во внутренней мембране *Escherichia coli* доля этого анионного липида достигает 20% [10]. Для многокомпонентных липидных бислоев наблюдается тенденция к кластеризации однотипных

липидов (см. далее). Таким образом, анионные кластеры ФГ являются отличительной особенностью бактериальных мембран, что определяет механизм селективного действия катионных АМП и, в частности, их предпочтительное связывание с ФГ кластерами и соответствующий этому МО, который заключается в изменении локальной концентрации ФГ и характера его распределения в мембране (см. далее).

3.2. Нанокластеры в липидных мембранах

Подробный анализ динамических неоднородностей на поверхности липидной мембраны можно эффективно осуществлять в рамках концепции так называемой «мозаичности» границы раздела мембрана–вода. Авторы называют подобный подход построением «динамического молекулярного портрета» (ДМП) поверхности мембраны, параметры которого уникальны для липидного бислоя заданного состава, находящегося в конкретных условиях (степень гидратации, фазовое состояние, наличие ионов и «внешних агентов», включая белки, пептиды и другие молекулы, взаимодействующие с клеточной мембраной). Учитывая специфику организации мембран, обе их поверхности могут быть достаточно точно аппроксимированы плоскостью (по крайней мере, в молекулярных масштабах). В результате соответствующие ДМП можно наглядно представить в виде двумерных (2D) карт распределения поверхностных свойств, которые эволюционируют с течением времени. В отличие от трехмерных (3D) объектов, ДМП в виде 2D-распределений лучше поддаются количественному анализу — их можно детально обработать с помощью численных методов: вычислить их средние характеристики и соответствующие стандартные отклонения; методами цифровой фильтрации выявить значимые паттерны и снизить уровень шума, наглядно графически представить; ДМП-карты различных состояний одной и той же системы или разных систем можно сравнивать между собой и т.д. (подробнее см. ниже, Раздел 5). Отметим, что аналогичные технологии работы с ДМП используют также и для анализа неплоских биологических молекулярных объектов, в частности глобулярных белков и/или их отдельных структурных элементов, например альфа-спиралей и т.д. [11]. В таких случаях ДМП создают путем проецирования свойств молекулярной поверхности на поверхность сферы [12] или цилиндра [13], соответственно.

Поскольку клеточные мембраны насыщены белками и другими молекулами [14], изучение эффектов латеральной гетерогенности сильно

затруднено из-за небольших площадей «свободного» липидного бислоя. Поэтому такой анализ, как правило, проводят на модельных системах, имитирующих клеточные мембраны, — гидратированных бислоях, состоящих из одного или нескольких типов липидов. Важной характеристикой ДМП биомембран является диапазон доступных для анализа их пространственно-временных характеристик. Наиболее изученными являются долгоживущие домены (кластеры) относительно больших размеров, превышающих 100 нм, — так называемые липидные «плоты» («рафты») и микродомены. В то же время более мелкие неоднородности — так называемые «нанодомены», или НК, гораздо менее изучены ввиду технических ограничений современных экспериментальных методов. НК имеют характерный размер < 10 нм, что соответствует группе лишь из несколькими плотно упакованных липидных молекул. Более того, время жизни НК часто не превышает нескольких наносекунд. Поэтому такие системы все еще находятся за пределами разрешения даже самых современных инструментальных средств, позволяющих напрямую регистрировать их в экспериментах. обстоятельные современные обзоры [15–18] дают полноценную картину текущего состояния исследований в предметной области.

Так как при рассмотрении НК речь идет о быстро меняющихся распределениях, может возникнуть ощущение, что из-за усреднения по большому числу состояний (например, полученных в результате расчетов молекулярной динамики (МД) или измеренных в эксперименте) связанные с этими нанобъектами явления существенно не влияют на макроскопические свойства липидного бислоя. Но это не так! В частности, роль микроскопических неоднородностей в мембранах обусловлена тем обстоятельством, что самоорганизация и функционирование наиболее важных классов мембранных белков — ионных каналов, рецепторов, ферментов и т.д. — могут критическим образом зависеть от свойств так называемых «кольцевых» (annular) липидов, образующих один-два ближайших молекулярных слоя (см., например, [16, 19, 20]). При этом характеристики последних могут сильно отличаться от параметров невозмущенного липидного бислоя. Еще один пример: известно, что локальные (~ 10 нм) дефекты кривизны поверхности мембраны могут служить сигналом к связыванию в этих областях ряда МАП [21], влияют на процессы слияния мембран [22] и др. Следовательно, необходимо понять атомистические детали механизмов формирования и эволюции ДМП клеточных мембран. Указанный подход основан на детальном анализе структурно-динамических параметров НК: их

идентификации, характеристике и определении соответствующих физических механизмов формирования/диссипации. Ряд важнейших аспектов данной проблемы обсуждается во всесторонних обзорах последних лет [15–18, 23].

3.3. Мозаичная гидрофобная поверхность бислоя

Нетривиальной (на первый взгляд) особенностью описанной выше «мозаичности» границы раздела мембрана–вода является наличие на ней динамических неполярных областей наноразмерного масштаба (рис. 1а). При этом указанная поверхность находится в контакте с водой, т.е. с полярной средой. Важно отметить, что такая картина характерна не только для каких-то одиночных конфигураций липидного бислоя, получаемых в ходе исследования фазового пространства методами МД, Монте-Карло и др. Она стабильно воспроизводится для всех изученных *in silico* модельных мембран, независимо от их липидного состава и параметров. Конечно, пространственно-временные характеристики таких гидрофобных «пятен» зависят от выбора конкретного бислоя и условий среды (температура, давление, степень гидратации и т.д.), но общий вывод об их присутствии на доступной воде поверхности мембраны остается неизменным. В дальнейшем мы будем их называть гидрофобными нанокластерами (гНК). Возникает вопрос, насколько реалистичным является подобное состояние системы?

Сразу заметим, что первые же сообщения о наблюдении наноразмерных гидрофобных «пятен» на поверхности гидратированных липидных бислоев [24] нашли живой отклик у экспериментаторов, которые независимо пришли к выводу о наличии в модельных мембранах подобных «гидрофобных дефектов», в частности, на основе данных спектроскопии ЯМР [25]. Дальнейшие экспериментальные и теоретические исследования полностью подтвердили реалистичность этой картины (см. [26, 27] и ссылки в обзоре [28]). Детальный вычислительный анализ большого набора модельных гидратированных мембран методами МД и картирования полярных свойств их поверхностей (см. [28]) позволил сделать следующие выводы:

- 1) гНК, как правило, имеют размеры, характерные для одной/нескольких молекул липидов, т.е. ~ 1 –10 нм, а времена их жизни составляют до ~ 1 нс.
- 2) Суммарная доля площади поверхности мембраны, относящейся к гНК, варьирует примерно от 20 до 50% в зависимости от системы.
- 3) гНК формируются в разреженных (с относительно низкой плотностью) областях интерфейса,

т.е. между группами плотно упакованных липидов (НК) — на этих участках ацильные цепи липидов могут приближаться к поверхности бислоя («всплывать»). В результате их неполярные группы создают в своей окрестности (в том числе на поверхности) зоны с высокими значениями молекулярного гидрофобного потенциала (МГП), т.е. гидрофобные участки.

4) В отличие от областей плотно упакованных липидов (НК), гНК в основном соответствуют «впадинам» на ландшафте границы раздела (рис. 1а, 1б).

5) Степень сольватации гНК значительно ниже по сравнению с НК — молекулам воды энергетически менее выгодно взаимодействовать с экспонированными на поверхности алифатическими группами ацильных цепей липидов, поскольку нет возможности эффективного формирования с ними Н-связей.

Таким образом, мозаичность поверхности любого гидратированного липидного бислоя обусловлена комбинацией реализующихся на границе раздела фаз в данный момент времени динамических наноразмерных объектов — НК (группы плотно упакованных и сильно сольватированных липидов с большим числом водородных связей (Н-связей) различного типа), гНК (разреженные и слабо сольватированные области, в которых неполярные цепи липидов располагаются близко к поверхности), а также остальными липидами, не входящими в состав НК и гНК (рис. 1б). Как было сказано выше, для описания этих явлений удобно использовать концепцию ДМП. Важно заметить, что именно такая природа интерфейса необходима для осуществления мембранами их функции в клетке. Дело в том, что небольшие по размеру и быстро меняющие свои свойства элементы «мозаики» способны эффективно реагировать на появление/присутствие внешних агентов — МБ, МАП и пр., также обладающих ДМП с часто сопоставимыми параметрами. Это обуславливает взаимную адаптацию белок—мембрана, жизненно необходимую для нормальной работы клетки. В случае же однородного по свойствам полярного (за счет контакта с водой) интерфейса подобные процессы МО были бы крайне затруднены, учитывая амфифильную природу белков и пептидов, которые призваны функционировать в мембранах клетки. Обладая высокой степенью инертности, мембрана просто не успевала бы реагировать на присутствие сторонних молекул. Можно предположить, что именно поэтому мембраны, не обладающие мозаичной поверхностью, не встречаются в живых системах.

3.4. Геометрия бислоя и упаковка липидных молекул

Ключевыми параметрами бислоя, изменяющимися в ходе МО, являются: площадь поверхности мембраны, приходящаяся на молекулу липида (A_L); толщина липидного бислоя (D_{pp}); величина и характеристики областей свободного объема в бислое; распределение молекул воды и ионов в мембране; параметр порядка ацильных цепей липидов (S_D); коэффициент диффузии (как правило, латеральной) липидов в бислое. Первые четыре величины описывают геометрические свойства мембраны, а две оставшиеся — ее динамическое поведение. Численные оценки этих параметров не представляют проблем — в современных пакетах программ молекулярного моделирования их рассчитывают с помощью стандартных утилит.

Как правило, оценивают макроскопические средние значения рассматриваемых параметров, полученных в результате анализа рассчитанных методами МД и/или Монте-Карло ансамблей состояний модельных липидных бислоев. Ценность этих данных заключается в возможности их прямого сопоставления с результатами экспериментов. Это позволяет оценить корректность применяемых при моделировании мембран параметров силового поля и вычислительных протоколов. Учитывая большое число приближений, допускаемых в методах молекулярного моделирования, основанных на использовании классических силовых полей, подобная проверка путем сравнения с прямыми экспериментальными данными является крайне важной. Часто анализ результатов моделирования мембран начинают именно с такой калибровки, например, проводя расчеты молекулярной динамики/Монте-Карло ряда модельных липидных бислоев с известными из эксперимента макроскопическими структурно-динамическими параметрами, а уже затем исследуют более тонкие эффекты, связанные с усложнением состава мембраны, добавлением молекул пептидов и белков и пр.

В отличие от данных, получаемых в большинстве экспериментальных подходов, методы компьютерного моделирования мембран позволяют количественно оценивать не только их интегральные средние параметры (см. выше), но и фокусироваться на таковых для отдельных подмножеств системы. Например, рассчитывая величины A_L , D_{pp} , S_D для молекул липидов, непосредственно взаимодействующих/не взаимодействующих с белком, формирующих кластеры в бислое и находящихся вне их, для липидов разного типа и т.д. В этом, безусловно, заключается преимущество методов *in silico*, конечно, при условии упомянутой выше

постоянной тщательной калибровки точности вычислительных подходов по экспериментальным данным.

Помимо стандартного подхода к расчету геометрических параметров липидных бислоев — макроскопических средних значений, вычисляемых для ансамбля равновесных конфигураций системы, — ценную информацию предоставляет расчет 3D-карт «ландшафта» поверхности мембраны, полученных с атомистическим разрешением (рис. 16). На этих картах локальные параметры толщины бислоя формируют рельеф поверхности, а плотность упаковки липидов можно изобразить цветом, контурными изолиниями и т.д.

Представленные выше характеристики мембран обусловлены реализацией большого числа внутри- и межмолекулярных взаимодействий в системе, описываемых в настоящем подходе в рамках концепции классического эмпирического силового поля. В первом случае речь идет об изменении конформации молекул липидов и белка (в отдельных случаях — воды), во втором — о всех возможных контактах компонентов системы (липиды, вода, белок/пептид, ионы и пр.) Рассчитываемые эффекты изменения внутримолекулярных взаимодействий выражаются в картине конформационной динамики липидов, которую характеризует конфигурация ацильных цепей, полярных головок и молекул липидов в целом. В первом случае анализируют следующие параметры: заселенности *cis/trans*-состояний; ориентация цепи по отношению к нормали к плоскости мембраны (ось Z), отражающая степень упорядоченности «хвостов» (в терминах S_D); эффекты взаимного проникновения цепей монослоев (*interdigitation*) и др. Для полярных головок липидов, как правило, рассчитывают их ориентацию в пространстве, например, в терминах угла наклона вектора дипольного момента головки относительно оси Z, пространственного расположения (глубина вдоль Z, ориентация доноров/акцепторов Н-связей и т.д.) и т.д. Переходы между указанными конформационными состояниями можно охарактеризовать в терминах изменения свободной энергии и, следовательно, оценить энтальпийный вклад подобных эффектов в ходе МО. Соответствующие расчеты можно выполнить и для молекул мембранных белков и пептидов, что даст достаточно полную картину с точки зрения энергии внутримолекулярных взаимодействий.

Важнейшую роль в структурно-динамической организации липидного бислоя играют межмолекулярные взаимодействия: электростатические и ван-дер-ваальсовы. К первым относятся и Н-связи, вносящие существенный вклад в энергию

системы благодаря многочисленным донорам/акцепторам Н-связей и большому выигрышу в энергии, достигаемому при их формировании (~3–5 ккал/моль на связь). При рассмотрении эффектов МО проводят анализ всех типов Н-связей между молекулами липидов, белка, воды, включая связи типа «мостиков», т.е. между тремя и более, последовательно расположенными молекулами. Например, с участием воды. При этом необходимо учитывать, что свободная энергия формирования Н-связи сильно зависит от степени полярности локального окружения, т.е. от значения диэлектрической проницаемости среды (ϵ) [29, 30]. В неполярном окружении она значительно ниже, т.е. наиболее сильные связи наблюдаются на уровне карбонильных и фосфатных групп липидов. Это можно использовать, например, в рациональном проектировании мембран с направленно измененными свойствами — путем добавления в бислой искусственных липидов/липидомиметиков с определенным образом расположенными донорными/акцепторными группами (см. Раздел 5). Характерный для каждого конкретного бислоя динамический паттерн Н-связей является одним из основных параметров его уникального ДМП, определяя паттерны мозаичности поверхности мембраны, свойства НК, гНК и т.д. Установлена четкая корреляция между плотностью Н-связей и картиной латеральной гетерогенности бислоя: в липидных кластерах значительно больше Н-связей по сравнению с более разреженными областями (например, [28]).

В ходе МО, при встраивании белков/пептидов необходимо учитывать распределение и параметры Н-связей белок-липиды (плотность, время жизни, участвующие группы и т.д.), а также сопоставлять эту картину с таковой в невозмущенном бислое. Подобная информация требуется для выявления ключевых взаимодействий, ответственных за реализацию МО в заданных условиях. Помимо Н-связей, такой вид анализа проводят и для других типов электростатических взаимодействий — контактов заряженных групп, а также для невалентных ван-дер-ваальсовых взаимодействий и координационных связей с ионами. В рамках концепции ДМП результаты подобного анализа можно наглядно представить в виде 3D-изображений и/или 2D-карт с нанесенными значениями соответствующих характеристик — числа контактов, плотности конкретного типа взаимодействий и т.д. Это существенно усиливает информационную составляющую ДМП, отображающих свойства гидрофобности, рельефа, подвижности и пр. Главное, это позволяет связать характеристики ДМП с распределением энергии взаимодействий в системе

и, следовательно, помогает понять физические механизмы МО.

4. КЛЮЧЕВЫЕ МОДАЛЬНОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ, ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕМБРАНОЙ

МО представляет пример самоорганизации белок-липидных систем, при которой обе составляющие претерпевают изменения вследствие взаимной адаптации. Понимание физико-химических основ такой адаптации в ходе МО является необходимым для расшифровки детальных механизмов действия МАП, а также принципов упаковки и модуляции работы ТМД и функции МБ в целом. В данном разделе будет рассмотрено взаимное влияние разных факторов структурно-динамической организации липидного бислоя, а также МАП и ТМД на характер наблюдаемого МО в контексте биологической функции этих мембранных агентов.

4.1. Липидный состав

Особенности липидного состава мембран разного типа клеток могут служить фактором селективности для ряда АМП. Так, катионные АМП обладают повышенным сродством к липидным бислоям с высоким содержанием анионных липидов и, в частности, мембранам бактериальных клеток, богатых ФГ (см. выше). Для изучения механизмов дестабилизации мембран, вызванной АМП, уникальную возможность предоставляет

атомистическое моделирование таких агентов в смешанных липидных бислоях, например, микросекундная МД с использованием «крупнозернистых» моделей (например, MARTINI [31]) бислоев диолеилфосфатидилэтаноламин (ДОФЭ) / диолеил-ФГ (ДОФГ) в соотношении 70/30% [32]. На этой модели было показано, что катионный АМП Ltc1 из яда паука *Lachesana tarabaevi* в ходе связывания индуцирует кластеризацию ФГ в мембране (рис. 2а) при соотношении пептид:липид 1:20, близком к критическому значению, при котором наблюдается дестабилизация ФЭ/ФГ-бислоев в эксперименте. В частности, результаты 4-мкс МД для систем разных размеров (самая большая из них содержала 96 АМП и 2048 липидов) показывают, что связывание АМП модулирует динамику модельного ФЭ/ФГ-бислоя и индуцирует дальний порядок в структуре доменов ФГ. Таким образом результатом МО является стабильное разделение между двумя типами липидов, при котором не наблюдается структурных дефектов, таких как поры. Сходные механизмы действия по типу «кластера зарядов» были также описаны для небольших природных пептидов и синтетических пептидомиметиков [33]. В приведенном примере применение МД в крупнозернистом представлении помогает понять начальные стадии дестабилизации цитоплазматической бактериальной мембраны. Так, кластеризация ФГ, индуцированная АМП (рис. 2а), может приводить к снижению стабильности мембраны, при которой растущие дефекты на границе фаз могут быть ответственны

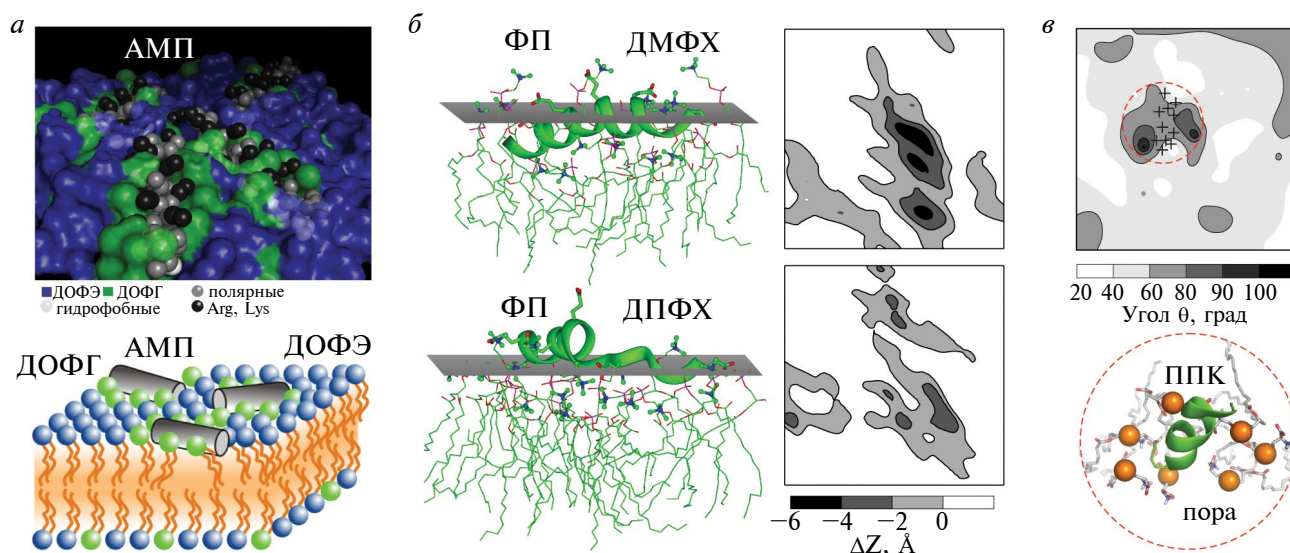


Рис. 2. Примеры МО в процессе взаимодействия МАП с модельными бислоями в ходе расчетов МД. а – Кластеризация анионных ФГ липидов (показано зеленым цветом) в «крупнозернистой» мембране ФЭ/ФГ при связывании АМП Ltc1. б – Модуляция ландшафта полноатомных бислоев ДМФХ и ДПФХ при взаимодействии с ними пептида слияния (ФП) из гемагглютинина вируса гриппа. в – Нарушение упаковки полярных головок ФС при связывании с пептидом-переносчиком (ППК) пенетратина.

за увеличение проницаемости бислоя. Интересно, что вызванная пептидами реорганизация липидов в бислоях может влиять и на функцию других компонентов мембраны, таких как мембранные белки, и приводить к нарушению метаболических процессов внутри клетки [34].

4.2. Текучесть и мозаичность поверхности

Селективное действие МАП может быть основано на их способности эффективно связываться с бислоями, обладающими определенной латеральной организацией и, в частности, динамическими характеристиками. Так, результаты сравнительного МД-анализа полноатомного моделирования ФП из вируса гриппа (Е5) в бислоях димиристоил-фосфатидхолин (ДМФХ) и дипальмитоил-ФХ (ДПФХ) показывают, что в обоих случаях присутствие мембраны существенно стабилизирует α -спиральную конформацию пептида в N-концевой области (2–11), тогда как С-концевой фрагмент оказывается менее структурированным. Пептид формирует стабильные комплексы с липидными бислоями, заякореваясь гидрофобными остатками в мембране. Гидрофильные остатки в основном экспонированы в водную фазу. Связывание и встраивание пептида приводит к дестабилизации липидных бислоев, однако МО имеет локальный характер — только для соседних липидов (10–15 молекул) наблюдаются существенные изменения структурно-динамических свойств. При этом ряд важных аспектов взаимодействия пептида с мембраной зависит от ее состава. Пептид глубже встраивается в более «рыхлый» бислой ДМФХ, чем в относительно плотный ДПФХ. Это также отражается в более заметном изменении локальной толщины мембраны, ширины контактной интерфейсной области и нарушении упаковки ацильных цепей липидов (рис. 2б). В процессе встраивания пептида бислой ДПФХ сохраняет свою целостность, за исключением заглубления нескольких липидов в область ацильных цепей. В то же время в мембране ДМФХ некоторые липидные молекулы в области связывания пептида оказываются вытесненными из плоскости бислоя в водную фазу, образуя при этом выгодные контакты с остатками глутаминовой кислоты ФП. Динамическое состояние мембраны (моделируемое в данном случае использованием липидов с разной длиной ацильных хвостов) может серьезно влиять на геометрию встраивания пептида. Так, угол наклона N-концевой α -спирали в бислой ДМФХ составляет $\sim 20^\circ$ в отличие от ее практически параллельной ориентации в мембране ДПФХ. В первом случае результаты МД воспроизводят экспериментально установленную моду связывания

фузионных пептидов [35], вторая мода связывания характерна для их неактивных аналогов [36, 37].

Для понимания детальных механизмов МО при связывании МАП необходимо исследование латеральных неоднородностей в липидном бислое. Например, использование алгоритмов картирования подвижности и ориентации полярных головок липидов (угол θ) в случае пептида-переносчика пенетратина в модельных бислоях диолеил-ФХ (ДОФХ) и диолеил-фосфатидилсерин (ДОФС) наглядно иллюстрируют принципы дестабилизации мембраны. В частности, 2D-карты для углов θ позволяют выявить локализацию дефектов в упаковке липидных головок относительно положения пептида (рис. 2в). Независимо от моды связывания, в бислой ДОФХ влияние пенетратина на геометрию липидных головок слабо выражено. Наиболее сильный эффект наблюдается в бислой ДОФС. Видно, что «в тени» пептида находится область, в которой полярные головки ориентируются практически параллельно бислою. Эта область сформирована наиболее выгодно взаимодействующими с пенетратинем молекулами ФС, в том числе участвующими в долгоживущих комплексах с остатками пептида. Структура наблюдаемого дефекта выглядит таким образом, что, меняя ориентацию головок, пептид в области контакта формирует разреженный участок интерфейса монослоя с доступной растворителю областью липидных хвостов (рис. 2г). Важно отметить, что липиды, образующие описанную структуру, обладают пониженной подвижностью — т.е. способность эффективно связывать заряженные липиды ФС позволяет пенетратину формировать «замороженные дефекты» на поверхности модельной мембраны. Наблюдаемый МО может быть связан с механизмом прямого переноса пептида через мембрану. Так, связывание пептидов на поверхности мембраны будет приводить к увеличению числа описанных дефектов, поэтому вновь связавшиеся пептиды получают возможность глубоко встраиваться внутрь мембраны. Это приводит к существенному изменению локальных электрических свойств мембраны, что при наличии отрицательного трансмембранного потенциала позволяет отдельным молекулам пенетратина преодолевать гидрофобную фазу бислоя. Основным условием возможности трансмембранного переноса по такому механизму является концентрационная зависимость, т.е. существование определенного порогового значения, при достижении которого возможно проникновение пептидов в клетку или модельную везикулу. Такой эффект описан в ряде работ [38, 39].

При этом методы картирования мозаичной мембраны показывают, что гидрофобная/гидрофильная организация бислоя может адаптироваться к динамическим свойствам взаимодействующего МАП в ходе МО. Например, в случае ФП гидрофобные/гидрофильные паттерны на поверхностях пептида и бислоя демонстрируют взаимное соответствие (комплементарность) в равновесном мембраносвязанном состоянии [40]. Аналогичная тенденция наблюдалась и при взаимодействии пенетратина с бислоями ДОФХ и ДОФС (см. выше) [41]. Детальный анализ поверхности мембраны выявил сложный «мозаичный» характер ее гидрофобных/гидрофильных свойств и образование временных гидрофобных кластеров [24]. Такая организация влияет на начальный этап взаимодействия пептида с мембраной. Соответствие гидрофобных свойств в области взаимодействия преимущественно наблюдается в случае анионных бислоев ДОФС, что способствует глубокому проникновению пептида в бислой такого состава.

4.3. Толщина гидрофобного слоя (D_{phob}) и фаза липидной мембраны

Для ТМД, которые встроены в бислой, его макроскопические параметры — такие как фаза и/или D_{phob} — являются ключевыми факторами, определяющими их структурную организацию и предпочтительную локализацию в клеточной мембране. Так, в исследованиях динамического поведения димеров спиральных ТМД в липидных бислоях с помощью МД и спектроскопии ЯМР выявили непосредственное влияние липидного окружения на соответствующую ему конфигурацию спиралей в димере [42–44]. В частности, соотношение между D_{phob} бислоя и длиной спирального ТМД может определять топологию димера и его наклон в мембране (рис. 3а), как в случае димера ТМД рецептора PDGFRb, чье динамическое поведение в бислоях ДМФХ, ПОФХ, ДЭФХ было исследовано с помощью метода полноатомной МД и твердотельной ЯМР-спектроскопии [42]. В данном случае длина и насыщенность липидных хвостов определяет D_{phob} бислоя, а также его динамические характеристики. В ходе МО угол наклона димера ТМД по отношению к нормали к плоскости мембраны увеличивается, и он становится менее устойчивым с уменьшением толщины модельной мембраны. Это указывает на то, что формирование такого димера ТМД и последующая активация рецептора в клетке могут быть связаны с локализацией в нанодоменах в жидко-упорядоченной фазе, для которых характерна большая величина D_{phob} (см. выше). В зависимости от параметров

бислоя, энергетически выгодными могут быть разные конфигурации димеров спиральных ТМД (например, с малым или большим значением угла скрещивания между спиральями), поэтому смена липидного окружения может менять конфигурацию такого димера [45] и, например, приводить к соответствующей активации рецептора [44], которая возможна только в определенном мембранном окружении [46–49]. ТМД, таким образом, является своеобразным сенсором свойств липидной среды, и в то же время липидное окружение выступает триггером разных состояний рецептора в процессе функционирования. Детальное понимание физического механизма МО, в результате которого бислой определяет конфигурацию димера ТМД, требует изучения специфического возмущения мембраны, вызванного присутствием ТМД [43, 44, 50]. Например, ТМД может вызывать упорядочивание («замораживание») липидного окружения (рис. 3б), что отражается в невыгодном энергетическом вкладе мембраны в энергию данной конфигурации. Напротив, в случае соответствия между конфигурацией димера ТМД и параметрами бислоя наблюдается обратный эффект [43].

4.4. Неоднородности упаковки и энтропийные эффекты

Другие аспекты МО в присутствии ТМД связаны с возмущением липидного окружения внутри бислоя (гомогенности упаковки гидрофобных цепей), вносимым экспонированной поверхностью ТМД в разных олигомерных состояниях. Например, заметное уменьшение степени гетерогенности упаковки липидов (число неоднородностей) в процессе димеризации за счет изменения свойств экспонированной поверхности ТМ спиралей связано с увеличением конфигурационной энтропии липидов и выгодным вкладом мембраны в свободную энергию ассоциации [50]. Так, результаты полноатомных МД расчетов показывают, что в случае одиночных ТМД МО связан с нарушением липидной упаковки, и, как следствие, наблюдается неравномерное распределение плотности липидов, как это видно на 2D-картах плотности, полученных для разных срезов бислоя вдоль нормали к плоскости мембраны (рис. 3в). Для «чистого» бислоя ПОФХ, в свою очередь, наблюдается более гомогенное распределение. Интересно, что наиболее заметный эффект наблюдается для срезов, соответствующих гидрофобному ядру бислоя. При этом для «чистого» бислоя распределение довольно размытое, что обеспечивает эффективное усреднение плотности за период наблюдения (200 нс), тогда как в присутствии ТМД можно наблюдать

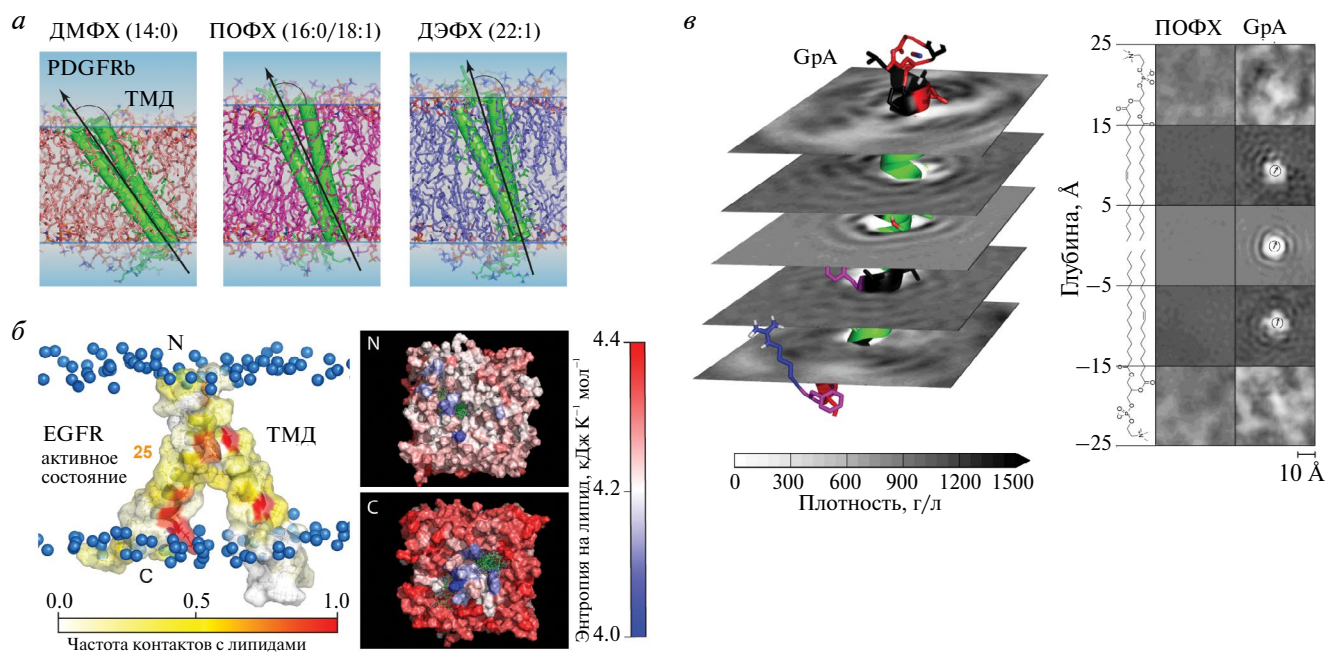


Рис. 3. Мембранный ответ в присутствии ТМД, наблюдаемый в ходе расчетов МД. *а* – Изменение угла наклона димера ТМД рецептора PDGFRb по отношению к нормали бислоя в зависимости от состава ацильных цепей (толщины гидрофобного слоя). *б* – Ограничение конфигурационной динамики липидных молекул ПОФХ в результате взаимодействия с димером ТМД рецептора EGFR. Поверхность ТМД окрашена в соответствии со значениями частоты липидных контактов в процессе МД (около 25 связанных молекул). Поверхность бислоя раскрашена в соответствии со значениями конфигурационной энтропии липидных молекул. *в* – Картирование неоднородности плотности липидных молекул ПОФХ вблизи мономерного ТМД гликофорина-А (GpA). Показаны двумерные карты плотности, полученные для срезов на разной глубине бислоя.

образование концентрических неоднородностей, где темные области отражают высокую среднюю плотность липидов, что соответствует «замороженным» липидным хвостам, прочно связанным с ТМД. Такие ограничения подвижности атомов ацильной цепи приводят к обеднению соседних областей и образованию «кольцеобразных» структур при усреднении по траектории МД. Наиболее заметные пики плотности, аналогичные первой сольватной оболочке в жидкостях, расположены в непосредственной близости от ТМД, при этом эффект постепенно затухает на больших расстояниях. Таким образом, наблюдаемые неоднородности липидной плотности в области ТМД связаны с ограничением подвижности липидных хвостов и имеют выраженную энтропийную природу. Адаптация к липидному окружению и соответствующий энтропийный эффект могут также лежать в основе переключения между неактивным и активным состояниями ТМД димера, что указывает на возможность непосредственного участия мембраны в работе рецептора [44]. В данном случае результаты полноатомной МД указывают на возможную активную роль ТМД рецептора EGFR в передаче сигнала через бислой, связанную с МО. Так, переключение между конфигурациями димера ТМД индуцирует

локальные липидные возмущения в N-концевой области (ближний к пептиду монослой) и понижение их энтропии (рис. 3б), где расположен более полярный тандемный GxxxG-подобный мотив. Это также вызывает изменение свойств липидного окружения внутреннего монослоя, что существенно для усиления сигнала рецептора в последующем каскаде и детерминированного ответа на связывание лиганда.

5. ЗНАНИЕ МЕХАНИЗМОВ МЕМБРАННОГО ОТВЕТА – КЛЮЧ К РАЦИОНАЛЬНОМУ ДИЗАЙНУ МЕМБРАННЫХ СИСТЕМ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

Понимание на молекулярном уровне физических механизмов МО создает предпосылки для рационального конструирования *in silico* систем с направленно измененными структурно-динамическими параметрами белок-мембранных взаимодействий. В качестве объектов такого дизайна используют как сами липидные бислои, так и связывающиеся с клеточными мембранами белки и пептиды. Рассмотрим соответствующие примеры, уже реализованные на практике.

5.1. Дизайн липидных бислоев с заданными свойствами

По-видимому, наиболее простым и эффективным способом модуляции характеристик МО является изменение состава липидного бислоя клеточной мембраны. Именно об этом подходе и пойдет речь ниже. Помимо него, воздействовать на процессы, связанные с МО, можно, меняя внешние условия, в частности, температуру, давление, степень гидратации липидов, ионную силу омывающего мембрану водного раствора и т.д. Однако эти подходы в настоящей работе не обсуждаются.

Как можно повлиять на параметры МО путем модификации липидного состава мембраны. Во-первых, зная в деталях ДМП модельных бислоев, состоящих из наиболее распространенных в природе липидов, а также соответствующие свойства (в терминах ДМП) заданного внешнего агента (белка и/или пептида), можно предложить вариант(ы) липидных бислоев, наилучшим образом подходящих для такого белок-мембранного взаимодействия. Имеется в виду, в частности, возможность достижения высокой степени комплементарности ДМП обоих участников при встраивании белка/пептида в липидную мембрану. Для решения этих задач необходимо иметь библиотеку ДМП модельных бислоев, а также вычислительные средства быстрой оценки ДМП белков и пептидов. Причем в каждом случае речь идет не об одном «портрете», а об их наборах, полученных для ансамбля равновесных состояний этих систем, например, методом МД. Как правило, подобные наборы данных создают для бислоев, содержащих один-два типа липидов и (часто) холестерин. Помимо прогнозирования МО путем использования природных липидов, большой интерес представляет проектирование на их основе искусственных соединений, способных нужным образом изменить параметры МО в липидном бислое, созданном путем добавления таких молекул к известным мембранным системам, либо целиком состоящих из предложенных модифицированных липидов. Ниже приведен пример подобного дизайна.

Поскольку МО во многом определяется свойствами мозаичности мембраны (см. Раздел 2), в частности, параметрами присутствующих в них динамических НК, разумно предположить, что модификация картины латеральной гетерогенности бислоя вызовет изменение МО. Известно, что одним из важнейших факторов, влияющих на данные эффекты, является распределение Н-связей липид-липид, входящих и не входящих в состав НК [28]. В последнее время были получены важные результаты о параметрах Н-связей в мембранах, включая

данные о роли холестерина [27, 51, 52], о зависимости свободной энергии образования Н-связи от значений локальной диэлектрической проницаемости среды (ϵ) [30] и т.д. В частности, было показано, что N- и O-метилирование сфингомиелина заметно влияет на его поведение в мембране и взаимодействие с холестерином. Так, указанная блокада донорных и акцепторных групп Н-связей в сфингомиелине нарушает образование упорядоченных доменов [53]. Это свидетельствует о важной роли аминокруппы сфингомиелина в процессе появления НК, специфичном для данного типа липидов. Эта идея получила дальнейшее развитие в осуществленной нами разработке искусственного липида на основе ДОФХ с измененным паттерном Н-связей. Предполагалось, что добавление этого соединения в бислой ДОФХ может потенциально повлиять на свойства мембраны. Цель – введение донора Н-связи (ОН-группу) в молекулу ДОФХ на глубине C=O групп немодифицированного липида (рис. 4а). Полученный липид (sn-1- β -гидрокси-диолеоил-ФХ) далее обозначается как ДОФХ-oh. Согласно результатам расчетов методом Монте-Карло в средах различной полярности (с различными значениями ϵ), именно в области расположения C=O групп ДОФХ, т.е. в неполярной среде ($\epsilon \sim 3$), наблюдается наиболее сильный эффект образования дополнительных Н-связей с участием молекул ДОФХ-oh [30]. МД-моделирование липидных бислоев, содержащих ДОФХ-oh, показало, что его добавление к мембране ДОФХ приводит к значительным изменениям ряда наиболее важных структурных и динамических свойств бислоя, определяющих его ДМП: сильное увеличение «контрастности» латерального распределения гидрофобных/гидрофильных свойств границы раздела мембрана/вода, изменение его доменной структуры (параметры НК), паттерны Н-связей и характеристики подвижности. Важно отметить, что такие «репортерные» молекулы искусственных липидов могут существенно изменять макроскопические средние свойства поверхности бислоя. Это хорошо видно на рис. 4а, где показаны усредненные карты распределения гидрофобных/гидрофильных свойств (выраженных в терминах МГП) на поверхности бислоя ДОФХ и бислоя, содержащего ДОФХ-oh. Такие эффекты описаны впервые, открывая новые возможности в рациональном проектировании искусственных мембран с заданными свойствами.

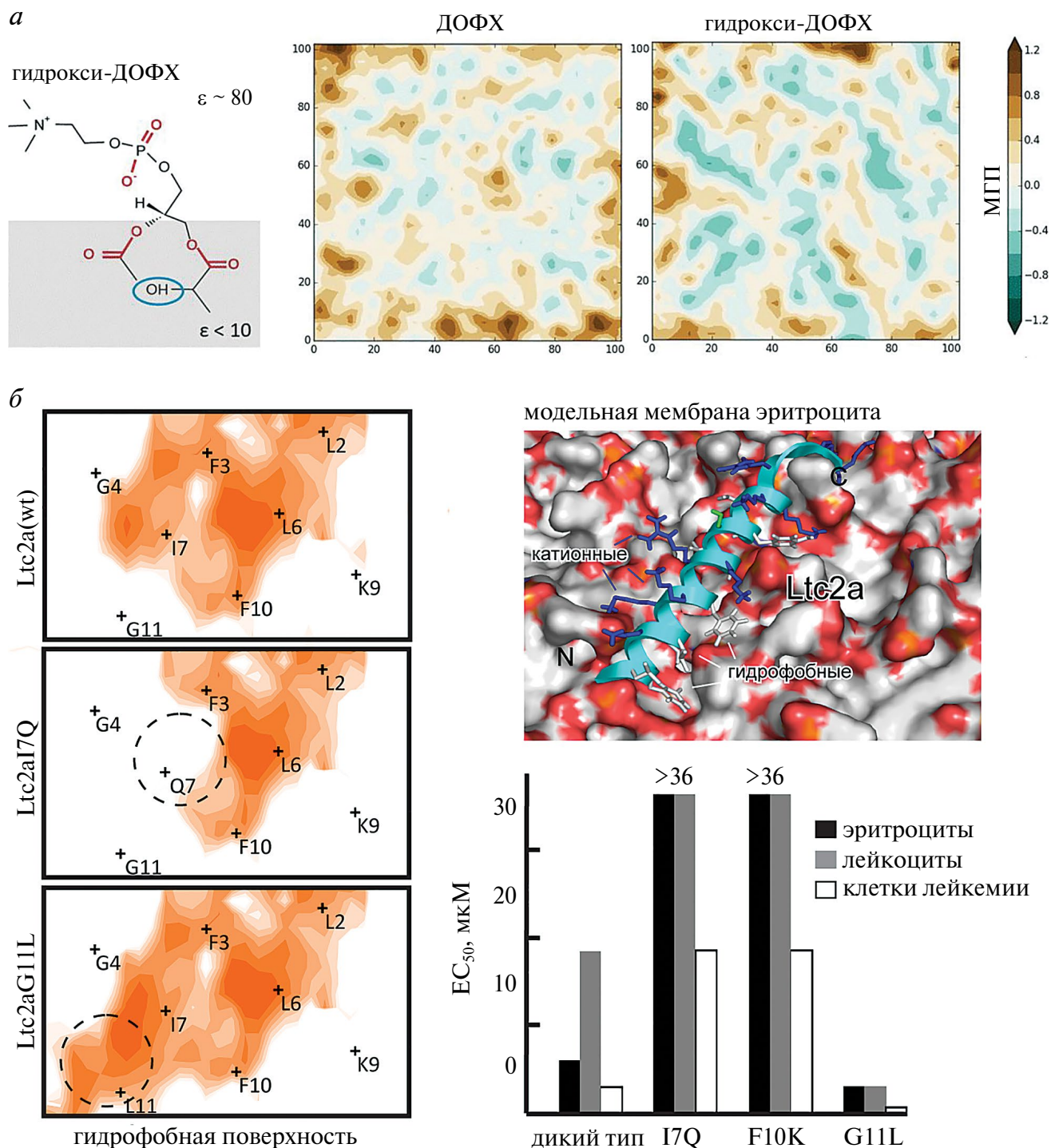


Рис. 4. Дизайн свойств бислоев и МАП. *а* – Схематичное изображение расположения молекулы sn-1-β-гидроксиди-олеилфосфатидилхолина (ДОФХ-oh) относительно мембраны, а также гидрофобная/гидрофильная организация поверхности бислоев ДОФХ и ДОФХ-oh (окраска по значениям МГП). Карты даны для одного липидного монослоя. Конфигурации системы взяты из МД-траекторий бислоев. Схема окраски для МГП показана справа. *б* – Двумерные карты гидрофобной поверхности в N-концевом участке для вариантов АМП Ltc2a с разной гемолитической активностью. Данные о цитотоксичности (в терминах полумаксимальной эффективной концентрации, EC₅₀) дикого типа и мутантных АМП показаны в виде диаграммы. Также показана МД-конфигурация Ltc2a дикого типа на поверхности модельной полноатомной мембраны эритроцитов (ПОФХ 40%, ПОФЭ 40%, холестерин 20%).

5.2. Дизайн селективного АМП на основании анализа мозаичности гидрофобной поверхности модельных мембран

Изучение гидрофобных/гидрофильных свойств N-концевых областей α -спиральных АМП с использованием подхода МГП выявило существенные различия между пептидами, обладающими гемолитической активностью и лишенными ее [54]. В частности, было показано, что гидрофобные паттерны в N-концевой области служат своеобразным триггером нежелательной цитотоксичности АМП. Например, в АМП Ltc2a N-концевая область является выражено амфифильной. Сравнение двумерных карт гидрофобной поверхности пептида и его МД-моды взаимодействия с модельным бислоем, имитирующим по составу мембрану эритроцитов (ПОФХ 40%, ПОФЭ 40%, холестерин 20%), позволяет выявить наиболее перспективные остатки для возможных мутаций — Ile7, Phe10, так как для них характерны низкая энергия взаимодействия с мембраной и локализация внутри обширных гидрофобных паттернов (рис. 4б). Кроме того, для используемой модельной цвиттер-ионной мембраны эритроцитов характерна более гидрофобная поверхность, чем для заряженной бактериальной мембраны (бислой ФЭ/ФГ). Таким образом, уменьшение площади гидрофобной поверхности Ltc2a должно приводить к понижению эффективности взаимодействий с цвиттер-ионными мембранами и его гемолитической активности. В частности, мутации Ile7 -> Gln, Phe10-Lys позволяют существенно уменьшить гемолитическую активность Ltc2a, сохраняя при этом антибактериальное действие практически на уровне пептида дикого типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важно отметить, что рассмотренные эффекты МО не являются лишь плодом компьютерного моделирования, а реально существуют как в модельных системах (гидратированных липидных бислоях, включая однокомпонентные), так и в мембранах живых клеток. Несмотря на атомистический характер описанных выше явлений, все еще труднодостижимых для анализа с помощью современных экспериментальных методов, целый ряд ключевых параметров МО был подтвержден прямыми наблюдениями. Во-первых, это касается «мозаичной» природы биомембран и наличия в них динамических нанокластеров, параметры которых хорошо согласуются с получаемыми в расчетах оценками (см. обзор [28] и соответствующие ссылки). Во-вторых, надежно установлены и детально

описаны ДМП «инициаторов» МО — мембранных и мембраноактивных белков и пептидов. Это сделано с использованием большого числа их расшифрованных пространственных структур и данных о конформационной динамике. Именно подобная склонность белков и мембран к взаимной адаптации создает фундаментальную основу их эффективной совместной работы в клетке. Можно сказать, что мы имеем дело с динамической парой «ключ—замок», в которой оба участника меняют свои параметры во времени в заданном диапазоне значений. При этом успешное решение (открытие замка) достигается в определенный момент времени при совпадении (комплементарности) формы ключа и замочной скважины. Аналогично, наиболее эффективное встраивание мембраноактивного белка/пептида («ключа») в клеточную мембрану («замок») происходит в случае, когда при сближении с поверхностью липидного бислоя физико-химические свойства контактирующей поверхности белка/пептида в некий момент времени наилучшим образом соответствуют (с высокой степенью комплементарности) таковым, реализующимся в соседних с ним зонах интерфейса мембрана—вода. Например, АМП с заданным гидрофобным/гидрофильным паттерном на поверхности наиболее сильно взаимодействуют с модельным бислоем, для которого параметры мозаичности интерфейса наилучшим образом отвечают указанному паттерну (см. Раздел 5). В работе такие эффекты мы характеризуем в терминах комплементарности ДМП партнеров. В случае же трансмембранных доменов белков подобное соответствие ДМП («ключ—замок») достигается путем структурно-динамической подстройки липидов (а также молекул воды и ионов на границе раздела фаз), окружающих ТМ фрагменты белка, под конкретные особенности его наружной поверхности. При этом свойства таких молекул среды могут кардинально отличаться от невозмущенных областей мембраны (см. примеры в Разделе 4).

Важно отметить, что понимание молекулярных аспектов и движущих сил рассмотренных тонких эффектов МО — липид-опосредованной адаптации белков/пептидов к мембранной среде — является мощным инструментом рационального дизайна обоих участников процесса. Соответствующие примеры даны в Разделе 5. Одним из высокоэффективных и уже неоднократно апробированных подходов к решению данной нетривиальной задачи является применение разрабатываемой авторами вычислительной технологии ДМП. При этом, конечно, надо иметь в виду, что для построения адекватных ДМП для заданной пары — мембраны и белка/пептида — необходимо использовать

тщательную калибровку применяемых компьютерных моделей по экспериментальным данным. С этой целью полезно использовать созданную в Отделе структурной биологии ИБХ РАН молекулярно-биофизическую платформу, включающую, помимо моделирования, спектроскопию ЯМР, оптическую спектроскопию и белковую инженерию [44]. Учитывая, что клеточные мембраны являются фармакологическими мишенями действия большинства современных лекарственных препаратов (в ряде случаев, например, при нейродегенеративных заболеваниях, их доля превышает 80%), решение рассматриваемой проблемы МО представляется чрезвычайно важным. В первую очередь, конечно, речь идет о понимании механизмов действия мембранных белков и пептидов, но, как авторы постарались показать в этом очерке, без корректного учета реакции водно-липидной среды подобную задачу не решить.

Каковы перспективы развития данного направления исследований? С точки зрения компьютерного моделирования эффектов МО, особый интерес представляют многомасштабные вычисления встроенных в мембрану сложных надмолекулярных белковых объектов, например, многосубъединичных ионных каналов, полноразмерных моделей рецепторов в олигомерном состоянии, мембраноактивных пептидов, агрегирующих на границе раздела фаз и т.д. Специальное внимание следует уделить идентификации и детальному описанию коллективных движений в мембранах, эффектам аллостерии и т.д. Работа в этом направлении представляется очень перспективной. Для валидации результатов таких расчетов необходимо привлекать новые структурно-динамические данные для белков и мембран, получаемые в экспериментах с высоким пространственно-временным разрешением. Здесь неопенимую пользу могут оказать активно разрабатываемые в настоящее время инструментальные методы регистрации одиночных молекул и их небольших групп, в частности, нанокластеров. Такие подходы реализуются в ЯМР-и ЭПР-спектроскопии, оптической спектроскопии, криоэлектронной микроскопии и пр.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 23-14-00313).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gennis R.B. 1989. *Biomembranes: Molecular structure and function*. Springer. 533 p.
2. Jørgensen K., Mouritsen O.G. 1995. Phase separation dynamics and lateral organization of two-component lipid membranes. *Biophys. J.* **69** (3), 942–954.
3. Brown D.A., London E. 1998. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* **164** (2), 103–114.
4. Lingwood D., Kaiser H.J., Levental I., Simons K. 2009. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem. Soc. Trans.* **37** (Pt 5), 955–960.
5. Freire E., Snyder B. 1980. Estimation of the lateral distribution of molecules in two-component lipid bilayers. *Biochemistry* **19** (1), 88–94.
6. Curatolo W., Sears B., Neuringer L.J. 1985. A calorimetry and deuterium NMR study of mixed model membranes of 1-palmitoyl-2-oleylphosphatidylcholine and saturated phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta* **817** (2), 261–270.
7. Pinkwart K., Schneider F., Lukoseviciute M., Sauka-Spengler T., Lyman E., Eggeling C., Sezgin E. 2019. Nanoscale dynamics of cholesterol in the cell membrane. *J. Biol. Chem.* **294** (34), 12599–12609.
8. Sezgin E., Levental I., Mayor S., Eggeling C. 2017. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18** (6), 361–374.
9. Fantini J., Barrantes F.J. 2013. How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Front. Physiol.* **4**, 31.
10. Sohlenkamp C., Geiger O. 2016. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* **40** (1), 133–159.
11. Efremov R.G., Chugunov A.O., Pyrkov T.V., Priestle J.P., Arseniev A.S., Jacoby E. 2007. Molecular lipophilicity in protein modeling and drug design. *Curr. Med. Chem.* **14** (4), 393–415.
12. Koromyslova A.D., Chugunov A.O., Efremov R.G. 2014. Deciphering fine molecular details of proteins' structure and function with a protein surface topography (PST) method. *J. Chem. Inf. Model.* **54** (4), 1189–1199.
13. Efremov R.G., Gulyaev D.I., Modyanov N.N. 1993. Application of three-dimensional molecular hydrophobicity potential to the analysis of spatial organization of membrane domains in proteins. III. Modeling of intramembrane moiety of Na⁺, K⁺-ATPase. *J. Protein. Chem.* **12** (2), 143–152.
14. Engelman D.M. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438** (7068), 578–580.
15. Cebecauer M., Amaro M., Jurkiewicz P., Sarmiento M.J., Šachl R., Cwiklik L., Hof M. 2018. Membrane lipid nanodomains. *Chem. Rev.* **118** (23), 11259–11297.

16. Enkavi G., Javanainen M., Kulig W., Róg T., Vattulainen I. 2019. Multiscale simulations of biological membranes: The challenge to understand biological phenomena in a living substance. *Chem. Rev.* **119** (9), 5607–5774.
17. Kinnun J.J., Bolmatov D., Lavrentovich M.O., Katsaras J. 2020. Lateral heterogeneity and domain formation in cellular membranes. *Chem. Phys. Lipids.* **232** 104976.
18. Kure J.L., Andersen C.B., Mortensen K.I., Wiseman P.W., Arnsperg E.C. Revealing plasma membrane nano-domains with diffusion analysis methods. *Membranes.* **10** (2020).
19. Phillips R., Ursell T., Wiggins P., Sens P. 2009. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature.* **459** (7245), 379–385.
20. Bocharov E.V., Mineev K.S., Pavlov K.V., Akimov S.A., Kuznetsov A.S., Efremov R.G., Arseniev A.S. 2017. Helix-helix interactions in membrane domains of biotopic proteins: Specificity and role of lipid environment. *Biochim. Biophys. Acta* **1859** (4), 561–576.
21. Vanni S., Hirose H., Barelli H., Antonny B., Gautier R. 2014. A sub-nanometre view of how membrane curvature and composition modulate lipid packing and protein recruitment. *Nat. Commun.* **5** (1), 4916.
22. Sharma S., Lindau M. 2017. t-SNARE transmembrane domain clustering modulates lipid organization and membrane curvature. *J. Am. Chem. Soc.* **139** (51), 18440–18443.
23. Schmid F. 2017. Physical mechanisms of micro- and nanodomain formation in multicomponent lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1859** (4), 509–528.
24. Polyansky A.A., Volynsky P.E., Arseniev A.S., Efremov R.G. 2009. Adaptation of a membrane-active peptide to heterogeneous environment. II. The role of mosaic nature of the membrane surface. *J. Phys. Chem. B.* **113** (4), 1120–1126.
25. Agmo Hernández V., Karlsson G., Edwards K. 2011. Intrinsic heterogeneity in liposome suspensions caused by the dynamic spontaneous formation of hydrophobic active sites in lipid membranes. *Langmuir.* **27** (8), 4873–4883.
26. de Wit G., Danial J.S., Kukura P., Wallace M.I. 2015. Dynamic label-free imaging of lipid nanodomains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112** (40), 12299–12303.
27. Yano Y., Hanashima S., Tsuchikawa H., Yasuda T., Slotte J.P., London E., Murata M. 2020. Sphingomyelins and ent-sphingomyelins form homophilic nanodomains within liquid ordered domains. *Biophys. J.* **119** (3), 539–552.
28. Efremov R.G. Dynamic “molecular portraits” of biomembranes drawn by their lateral nanoscale inhomogeneities. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021).
29. Boggs J.M. 1980. Intermolecular hydrogen bonding between lipids: influence on organization and function of lipids in membranes. *Can. J. Biochem.* **58** (10), 755–770.
30. Efremov R.G. 2019. Dielectric-dependent strength of interlipid hydrogen bonding in biomembranes: Model case study. *J. Chem. Inf. Model.* **59** (6), 2765–2775.
31. Marrink S.J., Risselada H.J., Yefimov S., Tieleman D.P., de Vries A.H. 2007. The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. *J. Phys. Chem. B* **111** (27), 7812–7824.
32. Polyansky A.A., Ramaswamy R., Volynsky P.E., Sbalzarini I.F., Marrink S.J., Efremov R.G. 2010. Antimicrobial peptides induce growth of phosphatidylglycerol domains in a model bacterial membrane. *J. Phys. Chem. Lett.* **1** (20), 3108–3111.
33. Epand R.F., Maloy W.L., Ramamoorthy A., Epand R.M. 2010. Probing the “charge cluster mechanism” in amphipathic helical cationic antimicrobial peptides. *Biochemistry* **49** (19), 4076–4084.
34. Pag U., Oedenkoven M., Sass V., Shai Y., Shamova O., Antcheva N., Tossi A., Sahl H.G. 2008. Analysis of in vitro activities and modes of action of synthetic antimicrobial peptides derived from an alpha-helical ‘sequence template’. *J. Antimicrob. Chemother.* **61** (2), 341–352.
35. Han X., Bushweller J.H., Cafiso D.S., Tamm L.K. 2001. Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat. Struct. Biol.* **8** (8), 715–720.
36. Efremov R.G., Nolde D.E., Volynsky P.E., Chernyavsky A.A., Dubovskii P.V., Arseniev A.S. 1999. Factors important for fusogenic activity of peptides: molecular modeling study of analogs of fusion peptide of influenza virus hemagglutinin. *FEBS Lett.* **462** (1), 205–210.
37. Vaccaro L., Cross K.J., Kleinjung J., Straus S.K., Thomas D.J., Wharton S.A., Skehel J.J., Fraternali F. 2005. Plasticity of influenza haemagglutinin fusion peptides and their interaction with lipid bilayers. *Biophys. J.* **88** (1), 25–36.
38. Magzoub M., Gräslund A. 2004. Cell-penetrating peptides: [corrected] from inception to application. *Q. Rev. Biophys.* **37** (2), 147–195.
39. Magzoub M., Pramanik A., Gräslund A. 2005. Modeling the endosomal escape of cell-penetrating peptides: Transmembrane pH gradient driven translocation across phospholipid bilayers. *Biochemistry* **44** (45), 14890–14897.
40. Volynsky P.E., Polyansky A.A., Simakov N.A., Arseniev A.S., Efremov R.G. 2005. Effect of lipid composition on the “membrane response” induced by a fusion peptide. *Biochemistry* **44** (44), 14626–14637.
41. Polyansky A.A., Volynsky P.E., Arseniev A.S., Efremov R.G. 2009. Adaptation of a membrane-active peptide to heterogeneous environment. I. Structural plasticity of the peptide. *J. Phys. Chem. B* **113** (4), 1107–1119.
42. Muhle-Goll C., Hoffmann S., Afonin S., Grage S.L., Polyansky A.A., Windisch D., Zeitler M., Bürck J., Ulrich A.S. 2012. Hydrophobic matching controls the tilt and stability of the dimeric platelet-derived growth

- factor receptor (PDGFR) β transmembrane segment. *J. Biol. Chem.* **287** (31), 26178–26186.
43. Polyansky A.A., Volynsky P.E., Efremov R.G. 2012. Multistate organization of transmembrane helical protein dimers governed by the host membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **134** (35), 14390–14400.
 44. Bocharov E.V., Bragin P.E., Pavlov K.V., Bocharova O.V., Mineev K.S., Polyansky A.A., Volynsky P.E., Efremov R.G., Arseniev A.S. 2017. The conformation of the epidermal growth factor receptor transmembrane domain dimer dynamically adapts to the local membrane environment. *Biochemistry* **56** (12), 1697–1705.
 45. Volynsky P.E., Polyansky A.A., Fakhrutdinova G.N., Bocharov E.V., Efremov R.G. 2013. Role of dimerization efficiency of transmembrane domains in activation of fibroblast growth factor receptor 3. *J. Am. Chem. Soc.* **135** (22), 8105–8108.
 46. Roepstorff K., Thomsen P., Sandvig K., van Deurs B. 2002. Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *J. Biol. Chem.* **277** (21), 18954–18960.
 47. Sottocornola E., Misasi R., Mattei V., Ciarlo L., Gradini R., Garofalo T., Berra B., Colombo I., Sorice M. 2006. Role of gangliosides in the association of ErbB2 with lipid rafts in mammary epithelial HC11 cells. *FEBS J.* **273** (8), 1821–1830.
 48. Rohwedder A., Knipp S., Roberts L.D., Ladbury J.E. 2021. Composition of receptor tyrosine kinase-mediated lipid micro-domains controlled by adaptor protein interaction. *Sci. Rep.* **11** (1), 6160.
 49. Roy A., Patra S.K. 2023. Lipid raft facilitated receptor organization and signaling: A functional rheostat in embryonic development, stem cell biology and cancer. *Stem Cell Rev. Rep.* **19** (1), 2–25.
 50. Kuznetsov A.S., Polyansky A.A., Fleck M., Volynsky P.E., Efremov R.G. 2015. Adaptable lipid matrix promotes protein–protein association in membranes. *J. Chem. Theory Comput.* **11** (9), 4415–4426.
 51. Matsumori N., Yamaguchi T., Maeta Y., Murata M. 2015. Orientation and order of the amide group of sphingomyelin in bilayers determined by solid-state NMR. *Biophys. J.* **108** (12), 2816–2824.
 52. Yasuda T., Kinoshita M., Murata M., Matsumori N. 2014. Detailed comparison of deuterium quadrupole profiles between sphingomyelin and phosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.* **106** (3), 631–638.
 53. Björkbohm A., Róg T., Kankaanpää P., Lindroos D., Kaszuba K., Kurita M., Yamaguchi S., Yamamoto T., Jaikishan S., Paavolainen L., Päivärinne J., Nyholm T.K.M., Katsumura S., Vattulainen I., Slotte J.P. 2011. N- and O-methylation of sphingomyelin markedly affects its membrane properties and interactions with cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta.* **1808** (4), 1179–1186.
 54. Polyansky A.A., Vassilevski A.A., Volynsky P.E., Vorontsova O.V., Samsonova O.V., Egorova N.S., Krylov N.A., Feofanov A.V., Arseniev A.S., Grishin E.V., Efremov R.G. 2009. N-terminal amphipathic helix as a trigger of hemolytic activity in antimicrobial peptides: A case study in laticarins. *FEBS Lett.* **583** (14), 2425–2428.

Lipid-Mediated Adaptation of Proteins and Peptides in Cell Membranes

© 2024 г. А. А. Polyansky¹, R. G. Efremov^{1, 2, 3, *}

¹*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

²*National Research University Higher School of Economics, Moscow, 101000 Russia*

³*Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Moscow oblast, 141701 Russia*

**e-mail: r-efremov@yandex.ru*

The paper overviews the results of computational studies of the molecular mechanisms underlying the adaptation of model cell membranes taking place during their interaction with proteins and peptides. We discuss changes in the structural and dynamic parameters of the water–lipid environment, the hydrophobic/hydrophilic organization of the lipid bilayer surface (the so-called “mosaicity”), etc. Taken together, these effects are called the “membrane response” (MR) and constitute the most important ability of the cell membranes to respond specifically and consistently to the incorporation of extraneous agents, primarily proteins and peptides, and their subsequent functioning. The results of the authors’ long-term research in the field of molecular modeling of MR processes with various spatial and temporal characteristics are described, from the effects of binding of individual lipid molecules to proteins to changes in the integral macroscopic parameters of membranes. The bulk of the results were obtained using the “dynamic molecular portrait” approach developed by the authors. The biological role of the observed phenomena and potential ways of rationally designing artificial membrane systems with specified MR characteristics are discussed. This, in turn, is important for targeted changes in the activity profile of proteins and peptides exerting action on biomembranes, not least as promising pharmacological agents.

Keywords: membrane proteins, molecular biophysics platform, computer modeling, molecular dynamics, “membrane response”, protein-lipid interactions