

# Влияние липидных конформаций на энергию взаимодействия мембраны и периферического белка

П. Е. Волынский<sup>+</sup>, А. С. Алексеева<sup>+</sup>, И. А. Болдырев<sup>\*1)</sup>

<sup>+</sup>Институт биоорганической химии им. Ю. А. Овчинникова и М. М. Шемякина РАН, 117997 Москва, Россия

<sup>\*</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, 119071 Москва, Россия

Поступила в редакцию 21 февраля 2024 г.

После переработки 17 марта 2024 г.

Принята к публикации 17 марта 2024 г.

Периферические мембранные белки временно связываются с поверхностью мембраны, заглубляясь в липидный слой. В этой работе мы показываем, что в зоне контакта периферических мембранных белков с мембраной уменьшается доля транс-конфигураций двугранных углов в гидрофобных цепях липидов. При этом, для разных цепей липида и для двугранных углов, находящихся на разном расстоянии от начала цепи, этот эффект разный. Гош-конфигурация обладает большей энергией по сравнению с транс-конфигурацией. Поэтому снижение доли транс-конфигураций означает, что энергия цепи увеличивается. Для периферического мембранного белка, использованного в настоящей работе, энергия конформаций цепей повышается на  $\approx 2$  кДж/моль. Изменение конформаций цепей – часть молекулярных механизмов, которые лежат в основе модуля упругости мембран. Энергия, запасенная в виде конформированной цепи, может быть израсходована на десорбцию белка с поверхности мембраны и может рассматриваться как причина того, что взаимодействие периферических мембранных белков и мембраны является временным.

DOI: 10.31857/S1234567824080111, EDN: ZKNKBD

**1. Введение.** Периферические мембранные белки (ПМБ) временно связываются с поверхностью мембраны, заглубляясь в липидный слой, и способны переходить с поверхности мембраны в раствор и обратно. Важность изучения ПМБ объясняется тем, что многие представители этого семейства имеют фармакологическое значение. Это относится к фосфолипазам [1, 2], цитохрому С [3], липидпереносящим белкам [4, 5], липоксигеназам [6, 7] и ацетилхолинэстеразам [8–10].

Формирование комплекса ПМБ/мембрана является определяющим этапом функционирования этих белков [11]. Однако то, что связывание является временным, усложняет изучение формирующихся комплексов. Так зарекомендовавшие себя методы структурной биологии – ЯМР высокого разрешения [12] и криоэлектронная микроскопия [13] – хорошо работают для интегральных мембранных белков, но не для ПМБ. Поэтому информацию о взаимодействии ПМБ с мембраной приходится собирать с помощью комплекса экспериментальных подходов [14], методов масс-спектрологии [15], молекулярной динамики [16] и физических моделей [17, 18]. При этом ни один из методов не дает возможность собрать полную картину взаимодействия ПМБ с мембраной.

Вопрос о том, как при связывании с ПМБ изменяются на молекулярном уровне липиды мембраны, изучен недостаточно. В этой работе мы исследуем, как меняются конформации гидрофобных цепей липидов при связывании на поверхности мембраны периферического белка.

**2. Материалы и методы.** В качестве объектов исследования мы использовали липид пальмитоил-фосфатидилхолин (ПОФХ) и классический периферический мембранный белок – секреторную фосфолипазу A2<sup>2)</sup> (сФЛА2) [23]. Контактная с мембраной, сФЛА2 ведет себя, как все ПМБ – связывается с поверхностью с помощью сети ионных и водо-

<sup>2)</sup>сФЛА2 гидролизует липиды на поверхности биологической мембраны и селективно отщепляет жирную кислоту из второго положения (*sn*-2) фосфолипида. Участок белка, контактирующий с поверхностью мембраны, принято называть мембран-связывающим сайтом (в англоязычной литературе – *interfacial binding site*, IBS). Он отвечает за удержание фермента на поверхности мембраны. Мембран-связывающий участок формируется несколькими десятками аминокислот и варьируется от фермента к ферменту [19]. Участок белка, непосредственно выполняющий гидролиз липидной молекулы, называют каталитическим сайтом. Активность и селективность сФЛА2 определяется совместной работой участка IBS и каталитического сайта [20, 21]. В дополнение к IBS и каталитическому сайту недавно были обнаружены дополнительные участки белка, отвечающие за перемещение фермента по мембране [22].

<sup>1)</sup>e-mail: i\_boldyrev@mail.ru

родных связей и гидрофобных взаимодействий. Связывание приводит к вытеснению полярных головок фосфолипидов из области контакта с белком. Под молекулой белка образуется гидрофобное пятно, а бислой в зоне контакта становится тоньше [24].

В этой работе данные получены с помощью моделирования молекулярной динамики взаимодействия белка сФЛА2 с бислоем их ПОФХ. Структуру белка получали из PDB (идентификатор PDB: 1ROC). Данные молекулярной динамики были верифицированы нами ранее экспериментально: 1) состояние мембраны коррелировало с данными флуоресцентной спектроскопии [24], 2) ориентация молекулы белка на поверхности мембраны коррелировала с данными атомно-силовой микроскопии [22]. Моделирование проводилось в два последовательных этапа: крупнозернистое (CG) и полноатомное моделирование.

На первом этапе расчеты проводились в программе Gromacs с использованием силового поля Martini 2.2 для белковой и стандартной липидной топологии [25]. Для сохранения структуры белка при создании его топологии использовалась схема резиновых связей [26]. Моделирование проводилось при 295 К. В расчетах использовались параметры, рекомендованные для расчета белково-мембранных систем с силовым полем Мартини 2.2 [27], а шаг интегрирования был уменьшен до 20 фс для получения корректных данных для динамики ароматических групп белка. Задачей первого этапа было получение МД модели белка, связанного на поверхности липидной мембраны.

На втором этапе поведение полученного связанного состояния исследовалось в полноатомном приближении. На втором этапе использовался пакет молекулярной динамики Gromacs [28] с параметрами силового поля Amber-14SB для белков [29], параметризацией липидных молекул Slipids [30] и моделью воды TIP3P [31]. Длительность траектории составила 500 нс. Ячейка моделирования содержала 450 молекул ПОФХ (225 молекул в одном слое) и одну молекулу сФЛА2.

В настоящей работе мы использовали концепцию множеств конформаций [32]. В этой концепции набор одинаковых молекул, в данном случае ПОФХ, разделяется на самостоятельные множества, каждое из которых характеризуется ключевой конформацией. Мы рассматриваем два множества. Одно состоит из молекул ПОФХ, контактирующих с белком. Второе состоит из молекул ПОФХ, не контактирующих с белком. Для каждой молекулы ПОФХ рассматриваются конформации гидрофобных цепей липидов, а

именно последовательности двугранных углов, которые могут принимать конфигурации транс или гош. Были рассчитаны все двугранные углы в ацильных цепях липидов для всех кадров на траектории МД. К транс конформации относили двугранные углы в диапазоне 150–210°. К гош конформации относили двугранные углы в диапазоне 30–90° (гош+) и 270–330° (гош-). Данные усредняли по всей траектории молекулярной динамики.

### 3. Результаты и обсуждение.

**3.1. Связывание сФЛА2 на поверхности мембраны.** Липидный бислой из ПОФХ с адсорбированной на нем молекулой фермента представлен на рис. 1. Это снимок траектории молекулярной динамики. Видно, что белок раздвигает в стороны полярные головки липидов. В результате в месте контакта на поверхности мембраны образуется гидрофобное пятно, экранированное от воды молекулой белка. Сайт IBS белка контактирует непосредственно с гидрофобными цепями липидов. В области контакта бислой становится тоньше.

**3.2. Конформации гидрофобных цепей.** Молекулы липидов могут взаимодействовать или не взаимодействовать с белком. К первому – множеству  $I$  – относятся молекулы, непосредственно контактирующие с белком. Ко второму – множеству  $N$  – относятся молекулы, которые не контактируют с белком. Каждый элемент множества  $N$  или  $I$  – это индивидуальная конформация цепи.

Для фосфатидилхолинов, к которым относится ПОФХ, число возможных конформаций полярной головки невелико относительно числа конформаций гидрофобной цепи. Поэтому далее мы рассматриваем только изменения конформаций гидрофобной цепи. Гидрофобные цепи ПОФХ представляют собой остатки пальмитиновой и олеиновой кислот (рис. 2а). В первом – 13 двугранных углов. Во втором – 12 двугранных углов и двойная связь по середине цепи. Двугранные углы в гидрофобных цепях липидов могут принимать конфигурации гош-, гош+ и транс. Разница энергии между конфигурациями транс и гош составляет 2 кДж/моль [33].

Поскольку конфигурации транс, гош+ и гош- переходят друг в друга, то конфигурацию  $i$ -го двугранного угла в ансамбле цепей можно представить как долю  $f_i$  транс конфигураций.  $f_i$  – доля транс конфигураций  $i$ -го двугранного угла среди всех гидрофобных цепей во всем множестве молекул, количество двугранных углов в транс конфигурации, деленное на число молекул в множестве. Тогда множество всех конформаций молекул в множестве можно упрощенно представить как ключевую (среднюю) конформа-

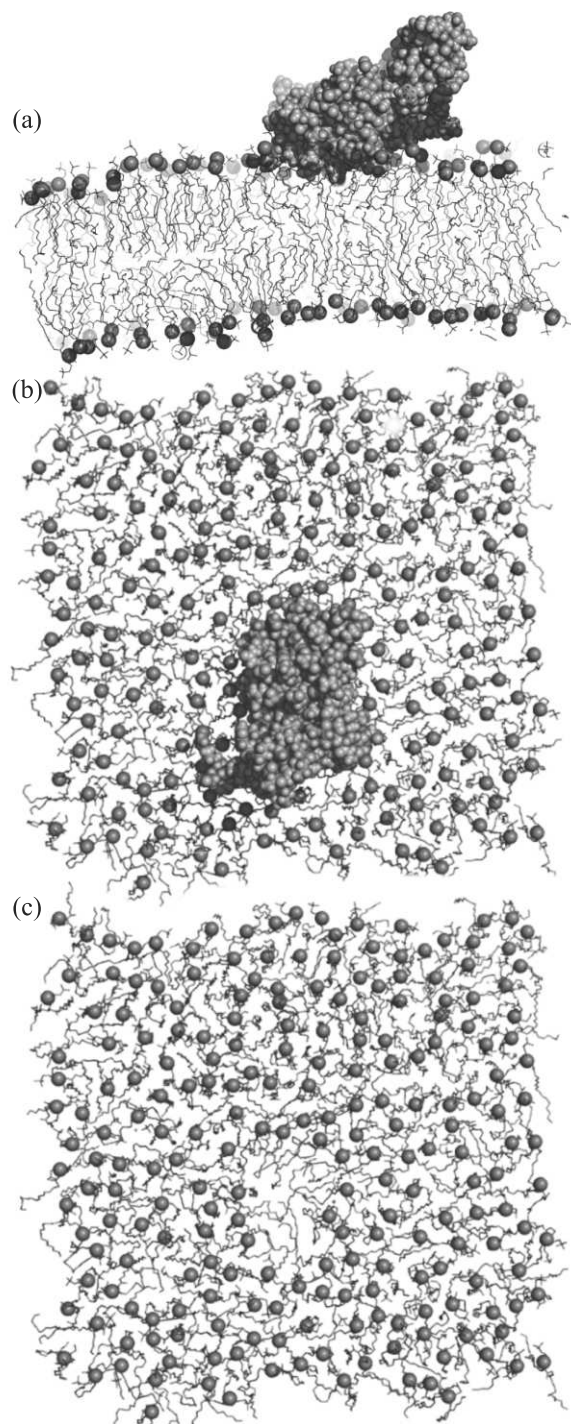


Рис. 1. (Цветной онлайн) Результаты молекулярной динамики: белок, адсорбированный на поверхности мембраны. (a) – Вид сбоку. (b) – Вид сверху. (c) – Вид сверху со скрытой молекулой белка. Белок выделен зеленым цветом. Молекулы липидов отрисованы черным. Атомы фосфора в молекулах липидов выделены оранжевым

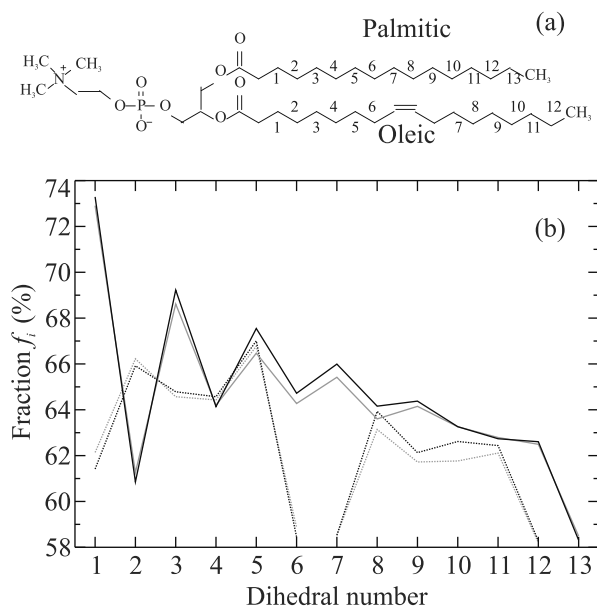


Рис. 2. (Цветной онлайн) (a) – Структура молекулы липида ПОФХ (пальмитоилолеилфосфатидилхолин) и нумерация двугранных углов в пальмитиновой и олеиновой цепях. (b) – Графическое представление ключевых конформаций – доля транс-конфигураций в пальмитиновой (сплошные линии) и олеиновой (пунктир) цепях липида. Черным цветом показана доля транс-конфигураций в цепях липидов, не контактирующих с белком – ключевая конформация  $N_k$ . Оранжевым – ключевая конформация  $I_k$ , липиды, контактирующие с белком

цию. Ключевая конформация представляет собой последовательность долей  $f_i$  для всех двугранных углов липидной цепи:

$$\begin{matrix} 1 & 2 & 3 & \dots & k \\ f_1 & f_2 & f_3 & \dots & f_k \end{matrix}$$

Каждое из множеств  $I$  и  $N$  мы представляем в виде ключевой конформации –  $I_k$  и  $N_k$  соответственно.

Энергию одной ключевой конформации можно определить по формуле:

$$E_{\text{conf}} = \sum_k (1 - f_i) * E_{t \rightarrow g}. \quad (1)$$

$E_{\text{conf}}$  представляет собой энергию одной гидрофобной цепи, усредненную по всему множеству  $N$  или  $I$ , а  $E_{t \rightarrow g}$  – энергия транс-гош перехода, оцениваемая в 2 кДж/Моль. Поскольку в молекуле ПОФХ две гидрофобных цепи, пальмитиновая и олеиновая, то общая энергия молекулы будет суммой энергий конформаций цепей:

$$E_{\text{mol}} = E_{\text{palm}} + E_{\text{ole}}. \quad (2)$$

Использование понятия ключевой конформации дает возможность сравнивать энергию липидов, находящихся в контакте с мембранным белком и не контактирующих с ним.

Разница энергии между молекулой, находящейся в области контакта, и вне ее равна:

$$\Delta E = E_{\text{mol } N} - E_{\text{mol } I} \quad (3)$$

Ключевые конформации для пальмитиновой и олеиновой цепей ПОФХ в мембране, контактирующей с белком, представлены на рис. 2.

Видно, что в зоне контакта уменьшается доля транс конфигураций. При этом для разных цепей и разных двугранных углов эффекты различны. Для пальмитинового остатка сильнее всего доля транс конфигураций снижается посередине цепи – в диапазоне от 5-го до 9-го двугранного угла. В начале цепи (углы 1-4) и в конце цепи (углы 12-13) доля транс конфигураций не зависит от присутствия белка. Для олеинового остатка картина в целом похожа – доля транс конфигураций снижается для цепей липидов, находящихся в контакте с белком. Однако характер изменений отличается – наибольшее уменьшение доли транс конфигураций наблюдается в диапазоне от 8 до 11-го двугранного угла.

Гош-конфигурация обладает большей энергией по сравнению с транс-конфигурацией. Снижение доли транс конфигураций, возрастание доли гош конфигураций, означает увеличение энергии цепи. Данные на рис. 2 говорят о возрастании доли транс конфигурации вплоть до 2 % в сегменте цепи.

Рассчитанные энергии конформаций цепей и молекул в области контакта белка с мембраной и вне ее, а также  $\Delta E$  приведены в табл. 1.

**Таблица 1.** Энергия конформации цепей, кДж/моль

|                   | <i>I</i> | <i>N</i> |
|-------------------|----------|----------|
| $E_{\text{palm}}$ | 9.2255   | 9.1596   |
| $E_{\text{ole}}$  | 9.0304   | 8.9987   |
| $E_{\text{mol}}$  | 18.2559  | 18.1583  |
| $\Delta E$        |          | 0.09765  |

Как видно из табл. 1, разница энергии между молекулой липида в области контакта белка с мембраной и вне ее составляет 0.0976 кДж/Моль. При этом энергия молекулы, находящейся в области контакта, оказывается выше. Таким образом, связывание белка приводит к появлению конформаций с увеличенной энергией. Значение  $\Delta E$  невелико. Однако в контакте с белком находится несколько липидов, поэтому для получения конформационного вклада в энергию взаимодействия нужно умножить  $\Delta E$  на число молекул

липидов, находящихся в контакте с белком. Последнее следует из траектории молекулярной динамики (рис. 3а).

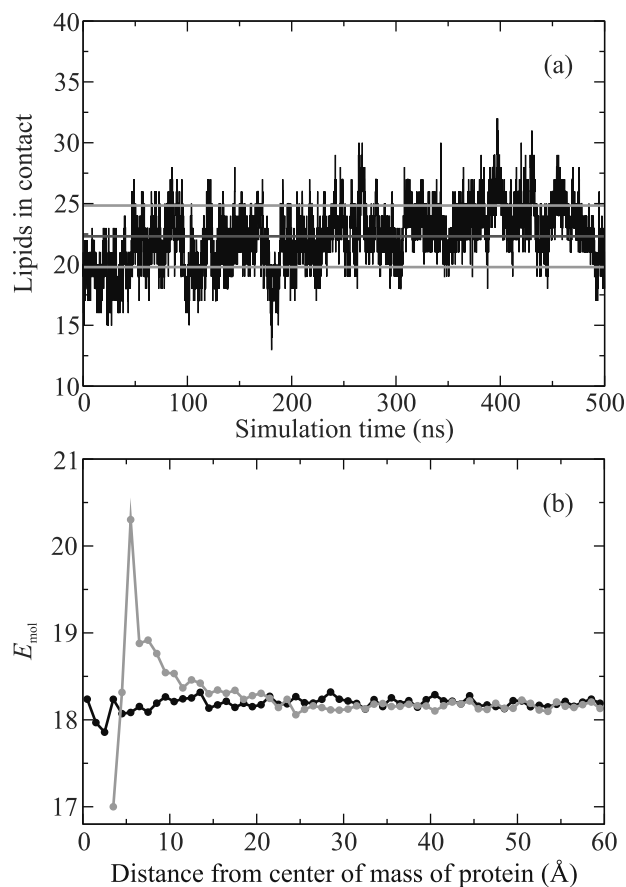


Рис. 3. (Цветной онлайн) (а) – Число молекул липидов, находящихся в контакте с молекулой белка по траектории молекулярной динамики. Черным цветом обозначено фактическое число молекул в данный момент времени. Красным – среднее значение по всей траектории, оранжевым – стандартное отклонение. (б) – Энергия молекулы в зависимости от расстояния от центра масс белка. Оранжевый – молекулы в монослое мембраны, контактирующем с белком. Черный – молекулы в противоположном от белка монослое

Из рисунка 3а видно, что число липидов, находящихся в контакте с белком, составляет  $22.3 \pm 2.5$  молекул. Это дает оценку конформационного вклада в энергию взаимодействия белка с мембраной в 1.9–2.4 кДж/Моль, т.е. величину, сопоставимую со значением  $k_B T$ .

Для оценки конформационного вклада в энергию взаимодействия мы использовали усреднение по всем липидам в множествах *I* и *N*. Однако энергия конформаций индивидуальной молекулы зависит от того, на каком расстоянии от белка находится эта мо-

лекула (рис. 3b). Рисунок 3b показывает, что в области контакта белка с мембраной энергия конформации молекулы липида заметно повышается. Одновременно в противоположном монослое, не контактирующим с белком, изменения энергии конформации практически не заметны. Эффект быстро затухает – уже на расстоянии 15 Å от центра белка энергии конформации молекул в обоих монослоях оказываются равными (рис. 3b).

Энергия изменения конформаций гидрофобных цепей – часть тех возмущений, которые белок вносит в мембрану. К другим возмущениям этого рода относятся изменение ориентации полярных головок, нарушение и образование ионных и водородных связей, перестройка дипольных контактов. В гидрофобных цепях взаимодействие с белком приводит к повышению доли гош конфигураций, а значит к увеличению энергии цепей. Связывание ПМБ с мембраной, которое в целом определяется гидрофобными и электростатическими взаимодействиями, энергетически выгодно. Поэтому энергия конформаций по знаку противоположна энергии взаимодействия белка с мембраной, т.е. на изменение конформаций необходимо затратить энергию. Фактически часть энергии взаимодействия ПМБ с мембраной расходуется на изменение конформаций цепей липидов. С теоретической точки зрения сопротивление мембраны описывается модулем упругости мембраны. Изменение конформаций цепей – часть молекулярных механизмов, которые лежат в основе модуля упругости мембран. С точки зрения молекулярной биологии запасенная в виде конформаций цепей энергия может расходоваться на десорбцию белка с поверхности мембраны и, таким образом, объясняет на молекулярном уровне, почему взаимодействие ПМБ с мембраной является временным.

**4. Заключение.** Гидрофобные цепи липидов способны принимать множество различных конформаций. Это их свойство определяет способность липидной мембраны адаптироваться к внешним воздействиям, таким как связывание периферических белков на ее поверхности. В ходе связывания ПМБ гидрофобные цепи липидов меняют свои конформации таким образом, что в зоне контакта белка с мембраной уменьшается доля транс-конфигураций двугранных углов. При этом энергия цепи увеличивается.

**Финансирование работы.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант # 21-75-00113.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

1. M. A. Frohman, Trends in pharmacological sciences **36**(3), 137 (2015).
2. N.D. Quach, R.D. Arnold, and B.S. Cummings, Biochemical pharmacology **90**(4), 338 (2014).
3. T. Eleftheriadis, G. Pissas, V. Liakopoulos, and I. Stefanidis, Frontiers in immunology **7**, 279 (2016).
4. J. Yang and M. S. Stack, Cancers **12**(11), 3469 (2020).
5. E. C. Quint ao and P. M. Cazita, Atherosclerosis **209**(1), 1 (2010).
6. H. Karatas and C. Cakir-Aktas, Archives of Neuropsychiatry **56**(4), 288 (2019).
7. K. van Leyen, *Lipoxygenase: an emerging target for stroke therapy, CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, Bentham Science Publishers (2013), v. 12(2), p. 191; <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cnsnddt/2013/00000012/00000002/art00005>
8. U. Holzgrabe, P. Kapková, V. Alptüzün, J. Scheiber, and E. Kugelman, Expert Opin. Ther. Targets **11**(2), 161 (2007).
9. M. Singh, M. Kaur, H. Kukreja, R. Chugh, O. Silakari, and D. Singh, Eur. J. Med. Chem. **70**, 165 (2013).
10. R. Benfante, S. Di Lascio, S. Cardani, and D. Fornasari, Aging Clinical and Experimental Research **33**(4), 82 (2021).
11. A. Whited and A. Johs, Chemistry and Physics of Lipids **192**, 51 (2015).
12. M. Necelis, C. McDermott, M.B. Dufrisne, C. Baryames, and L. Columbus, Current Opinion in Structural Biology **82**, 102654 (2023).
13. C. Thangaratnarajah, J. Rheinberger, and C. Paulino, Current Opinion in Structural Biology **76**, 102440 (2022).
14. W. Cho, L. Bittova, and R. V. Stahelin, Anal. Biochem. **296**(2), 153 (2001).
15. C. Sahin, D. J. Reid, M. T. Marty, and M. Landreh, Biochem. Soc. Trans. **48**(2), 547 (2020).
16. J. Guo, Y. Bao, M. Li, S. Li, L. Xi, P. Xin, L. Wu, H. Liu, and Y. Mu, Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. **13**(6), e1679 (2023).
17. O. V. Kondrashov and S. A. Akimov, J. Chem. Phys. **157**(7), 074902 (2022).
18. O. V. Kondrashov and S. A. Akimov, Biomolecules **13**(12), 1731 (2023).
19. J. Winget, Y. Pan, and B. Bahnson, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids **1761**(11), 1260 (2006).
20. Алексеева and Болдырев, Биологические мембраны **37**(5), 323 (2020).
21. A. Alekseeva, A. Korotaeva, E. Samoilova, P. Volynsky, E. Vodovozova, and Biochem. Biophys. Res. Commun. **454**(1), 178 (2014).

22. N. Kuzmina, P. Volynsky, I. Boldyrev, and A. Alekseeva, *Toxins* **14**(10), 669 (2022).
23. E. Dennis, J. Cao, Y.-H. Hsu, V. Magrioti, and G. Kokotos, *Chemical reviews* **111**(10), 6130 (2011).
24. A. Alekseeva, P. Volynsky, N. Krylov, V. Chernikov, E. Vodovozova, and I. Boldyrev, *Biochim. Biophys. Acta* **1863**(1), 183481 (2021).
25. S. J. Marrink, H. J. Risselada, S. Yefimov, D. P. Tieleman, and A. H. De Vries, *J. Phys. Chem. B* **111**(27), 7812 (2007).
26. X. Periole, M. Cavalli, S.-J. Marrink, and M. A. Ceruso, *J. Chem. Theory Comput.* **5**(9), 2531 (2009).
27. D. H. De Jong, S. Baoukina, H. I. Ingólfsson, and S. J. Marrink, *Comput. Phys. Commun.* **199**, 1 (2016).
28. M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. C. Smith, B. Hess, and E. Lindahl, *SoftwareX* **1**, 19 (2015).
29. J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. E. Hauser, and C. Simmerling, *J. Chem. Theory Comput.* **11**(8), 3696 (2015).
30. J. P. Jambeck and A. P. Lyubartsev, *J. Chem. Theory Comput.* **9**(1), 774 (2013).
31. W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **79**(2), 926 (1983).
32. Болдырев, Письма в ЖЭТФ **119**(7), 546 (2024).
33. I. Kanesaka, R. G. Snyder, and H. L. Strauss, *J. Chem. Phys.* **84**(1), 395 (1986).