

УДК 548.5

ПРОВЕРКА ПРИМЕНИМОСТИ КРУПНОЗЕРНИСТОГО СИЛОВОГО ПОЛЯ MARTINI ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ ОЛИГОМЕРОВ В КРИСТАЛЛИЗАЦИОННОМ РАСТВОРЕ

© 2024 г. Ю. В. Кордонская^{1,*}, В. И. Тимофеев^{1,2}, М. А. Марченкова^{1,2},
Ю. В. Писаревский², Ю. А. Дьякова¹, М. В. Ковальчук^{1,2}

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова Курчатовского комплекса кристаллографии и фотоники
НИИ “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: yukord@mail.ru

Поступила в редакцию 07.06.2024 г.

После доработки 17.06.2024 г.

Принята к публикации 17.06.2024 г.

В кристаллизационных условиях смоделирована молекулярная динамика двух типов октамеров лизоцима в крупнозернистом силовом поле MARTINI. Сравнительный анализ полученных результатов с данными моделирования этих же октамеров в полноатомном поле Amber99sb-ildn показал, что октамер А демонстрирует большую стабильность по сравнению с октамером В в обоих силовых полях. Таким образом, результаты моделирования молекулярной динамики октамеров с помощью обоих силовых полей согласуются. Несмотря на ряд различий в поведении белка в разных полях, они не влияют на справедливость данных, полученных с помощью MARTINI. Это подтверждает применимость силового поля MARTINI для изучения кристаллизационных растворов белков.

DOI: 10.31857/S0023476124050159, EDN: ZBQTXI

ВВЕДЕНИЕ

Выращивание белковых кристаллов является ключевым этапом в изучении функций белков и разработке новых фармацевтических препаратов. Это связано с тем, что экспериментально структура белка, которая определяет его функции, в большинстве случаев расшифровывается методом рентгеноструктурного анализа белковых кристаллов. Однако получение таких кристаллов – сложная задача, нередко требующая больших усилий и осуществляемая методом проб и ошибок. Поэтому исследования механизмов кристаллизации белков и характеристик белковых кристаллов (таких как наличие дефектов, степень мозаичности и концентрация воды в кристаллической решетке) играют важную роль при разработке методик для определения оптимальных условий кристаллизации.

С помощью малоуглового рентгеновского рассеяния в ряде работ было обнаружено, что в кристаллизационных растворах некоторых белков (лизоцима [1, 2], протеиназы К [3], термолизина [4], и аминотрансферазы [5]) образуются белковые олигомеры (кластеры-прекурсоры кристаллов). Вероятно, структура этих кластеров является фрагментом кристаллической структуры будущего кристалла. Как показано в [6], стадии роста кристалла

белка обязательно предшествует формирование его олигомеров (при этом оно не гарантирует образования кристалла), что подчеркивает важность участия кластеров-прекурсоров в формировании белковых кристаллов.

Для изучения белковой кристаллизации среди прочих успешно применяется метод молекулярной динамики (МД). Например, с его использованием устанавливали конкретную форму кластера-прекурсора кристаллов лизоцима [7], протеиназы К [8], термолизина [9]. Помимо этого, с помощью МД моделировалось поведение квазибесконечного (из-за периодических граничных условий) белкового кристалла с воспроизведением точных кристаллизационных условий [10]; устанавливалась разница между стабильностью стрептавидин-биотинового комплекса в кристалле и растворе [11]; моделировалась динамика кристалла белка с использованием различных силовых полей и моделей воды [12]; исследовалось связывание молекул белка в процессе формирования кристалла [13]; анализировалась частота колебаний кристаллической решетки белковых кристаллов [14].

Однако “полноатомное” моделирование, где каждому атому ставится в соответствие одна частица,

имеет ряд ограничений, особенно в отношении пространственных и временных масштабов молекулярных систем и процессов, которые можно эффективно исследовать. Одним из способов их преодоления является использование крупнозернистых силовых полей, в которых несколько атомов специфическим образом объединяются в одну крупную (псевдо)частицу (или “зерно”). Это уменьшает количество взаимодействующих частиц в ячейке моделирования, что, в свою очередь, сокращает число арифметических операций, проводящихся при расчете сил, действующих на каждый атом (или зерно), и численном решении уравнений движения каждого атома (зерна). Более того, шаг интегрирования в крупнозернистом подходе увеличивается по сравнению с полноатомным моделированием, поскольку, во-первых, основное из множества допущений такой параметризации — игнорирование некоторых атомистических степеней свободы. В результате взаимодействия между частицами становятся эффективными, а энергетический ландшафт значительно упрощается, что позволяет существенно увеличить скорость выборки за счет потери деталей. Во-вторых, структурные и термодинамические свойства малочувствительны к размеру шага интегрирования [15]. Ускорение расчетов на 2–3 порядка открывает новые возможности для моделирования более крупных систем и более продолжительных процессов, значительно расширяя горизонты исследований в области молекулярного моделирования.

Среди крупнозернистых силовых полей одним из наиболее популярных и универсальных является поле MARTINI [16], изначально созданное для моделирования липидов, но затем его применение было распространено на белки [17]. Обычно четыре неводородных атома представляются одним зерном (частицей), за исключением кольцевых фрагментов молекул, которые задаются большим числом частиц (рис. 1). Также в MARTINI четыре молекулы воды объединяются в одно зерно. Зерна различаются по полярности и относительной силе взаимодействия друг с другом.

Несмотря на появление метода изучения белковой кристаллизации с помощью моделирования олигомеров, выделенных из кристаллической структуры белков [7–9], дополнительное использование крупнозернистого поля могло бы предоставить больше возможностей в отношении пространственных и временных масштабов. Как правило, продолжительность моделируемых процессов для систем размеров порядка сотен тысяч атомов (например, олигомер лизоцима в водном растворе) составляет 100 нс–1 мкс. По сравнению с этим, например, при МД-моделировании образования олигомеров (путем связывания мономеров) в условиях кристаллизации количество атомов в несколько раз увеличится, при этом время, за которое формируются олигомеры, неизвестно.

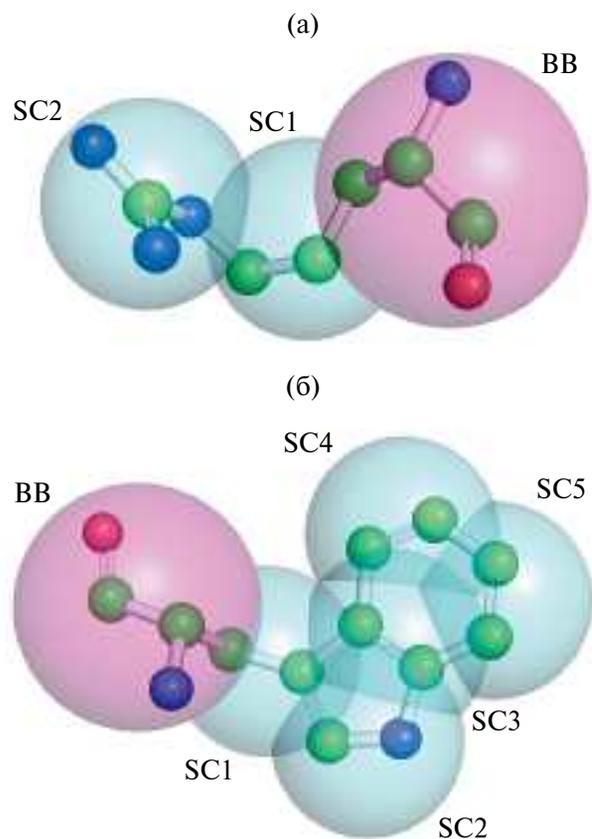


Рис. 1. Соответствие атомистической и крупнозернистой (в поле MARTINI) структуры аминокислотных остатков аргинина (а) и триптофана (б). Для наглядности атомы водорода скрыты. Полупрозрачными сферами показаны частицы в MARTINI: BB (Backbone) относится к основной цепи белка, а SC (Side Chain) — к боковой.

Таким образом, проверка применимости крупнозернистого моделирования МД для изучения кристаллизационных растворов белков, безусловно, представляет собой важную и актуальную задачу. Для ее решения в рамках данной работы с помощью крупнозернистого силового поля MARTINI [16, 18] в кристаллизационном растворе была смоделирована динамика двух типов (А и В, рис. 2) октамеров лизоцима, являющихся фрагментами его кристаллической (тетрагональной) структуры. Результаты моделирования были сопоставлены с данными, полученными ранее путем вычисления полноатомной МД [7]. В [7] было установлено, что лишь один из типов октамеров (А) представляет собой кластер-прекурсор кристалла лизоцима, в то время как другой (В) — распадается на составные элементы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Атомистические модели двух типов (А и В) октамеров лизоцима сначала были построены как в работе [7]. Затем на основе данных полноатомных структурных моделей с помощью скрипта martinize2.py [19] была сгенерирована топология белка в формате силового поля MARTINI 3 [16, 20].

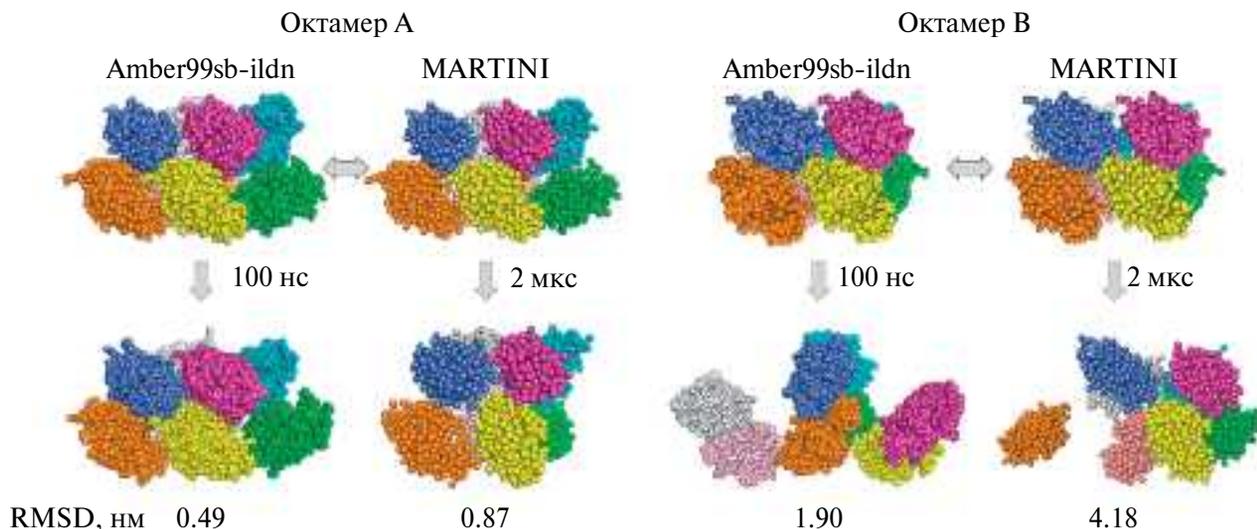


Рис. 2. Структура октамеров А (слева) и В (справа) в начале (сверху) и в конце (снизу) моделирования в полноатомном (Amber99sb-ildn) и крупнозернистом (MARTINI) силовых полях. В Amber99sb-ildn одна сфера соответствует одному атому, в MARTINI – группе атомов. Одна молекула содержит 1022 атома в Amber99sb-ildn и 304 зерна в MARTINI. Снизу приведены попарные RMSD между начальной и конечной структурой. Наглядно показано, что в обоих полях октамер В распадается, в то время как октамер А остается более стабильным.

В результате чего одна молекула лизоцима, состоящая из 129 аминокислотных остатков (а.о.), вместо 1022 атомов стала содержать 304 зерна (в 3.4 раза меньше, рис. 2).

Молекулярную динамику проводили с помощью пакета GROMACS версии 2023 [21]. Каждый олигомер помещали в центр кубической ячейки моделирования с периодическими граничными условиями. Добавление молекул воды и ионов осадителя (Na^+ , Cl^-) в концентрации 0.4 М (как в кристаллизационных условиях [1]) происходило с использованием скрипта insane.py [22], при этом минимальное расстояние между белком и гранью ячейки составило 7 нм. Для нейтрализации суммарного заряда каждой ячейки в раствор добавляли незначительное количество Cl^- .

Перед запуском продуктивной МД моделируемые системы подвергали минимизации энергии методом наискорейшего спуска до тех пор, пока максимальная сила на атом не становилась меньше 100 кДж/(М·нм). После этого ячейки уравнивали в течение 50 нс с использованием баростата C-gscale [23] в NPT-ансамбле. Расчеты продуктивной МД проводили в NPT-ансамбле с использованием термостата шкалирования скоростей (V-rescale [24]) при 20°C и баростата Парринелло–Рамана [25]. Интегрирование уравнений движения выполняли с помощью алгоритма “leap-frog” [26] с шагом 20 фс. Рассчитываемые методом реакционного поля [27] нековалентные электростатические взаимодействия вычисляли явно только в сфере радиусом 1.1 нм, а за ее пределами диэлектрическая постоянная оставалась однородной ($\epsilon_r = 15$). Ограничения на длины валентных связей в олигомерах

накладывались алгоритмом LINCS [28]. Продолжительность каждой рассчитанной траектории составила 2 мкс.

Для анализа полученных траекторий атомы белка были возвращены в начальную ячейку с помощью *gmx trjconv* с флагом *-pbc nojump*. Для структурного выравнивания по начальному положению атомов лизоцима использовали команду *gmx trjconv* с опцией *-fit rot+trans*. Значения среднеквадратичных флуктуаций положений атомов (RMSF), среднеквадратичных отклонений (RMSD) и радиус гирации (R_g) вычисляли только для C_α -атомов с помощью команд *gmx rmsf*, *gmx rms* и *gmx gyrate* соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки гибкости полипептидной цепи использовали график RMSF (рис. 3а, 3б) атомов C_α , который показывает степень отклонения каждого атома C_α от его среднего положения за все время моделирования. Большие значения RMSF и их широкий диапазон указывают на нестабильность белка. График RMSD (рис. 3в, 3г) демонстрирует усредненные отклонения атомов от их первоначального положения. В качестве показателя компактности октамера использовали радиус гирации R_g (рис. 3д, 3е).

Сравнение результатов моделирования октамеров лизоцима в различных полях на рис. 2, 3 выявляет ряд различий. На рис. 3а, 3б интервал между делениями горизонтальной оси составляет 129, что соответствует количеству а.о., входящих в одну полипептидную цепь лизоцима. Рисунок 3б показывает, что в поле MARTINI молекула октамера В с

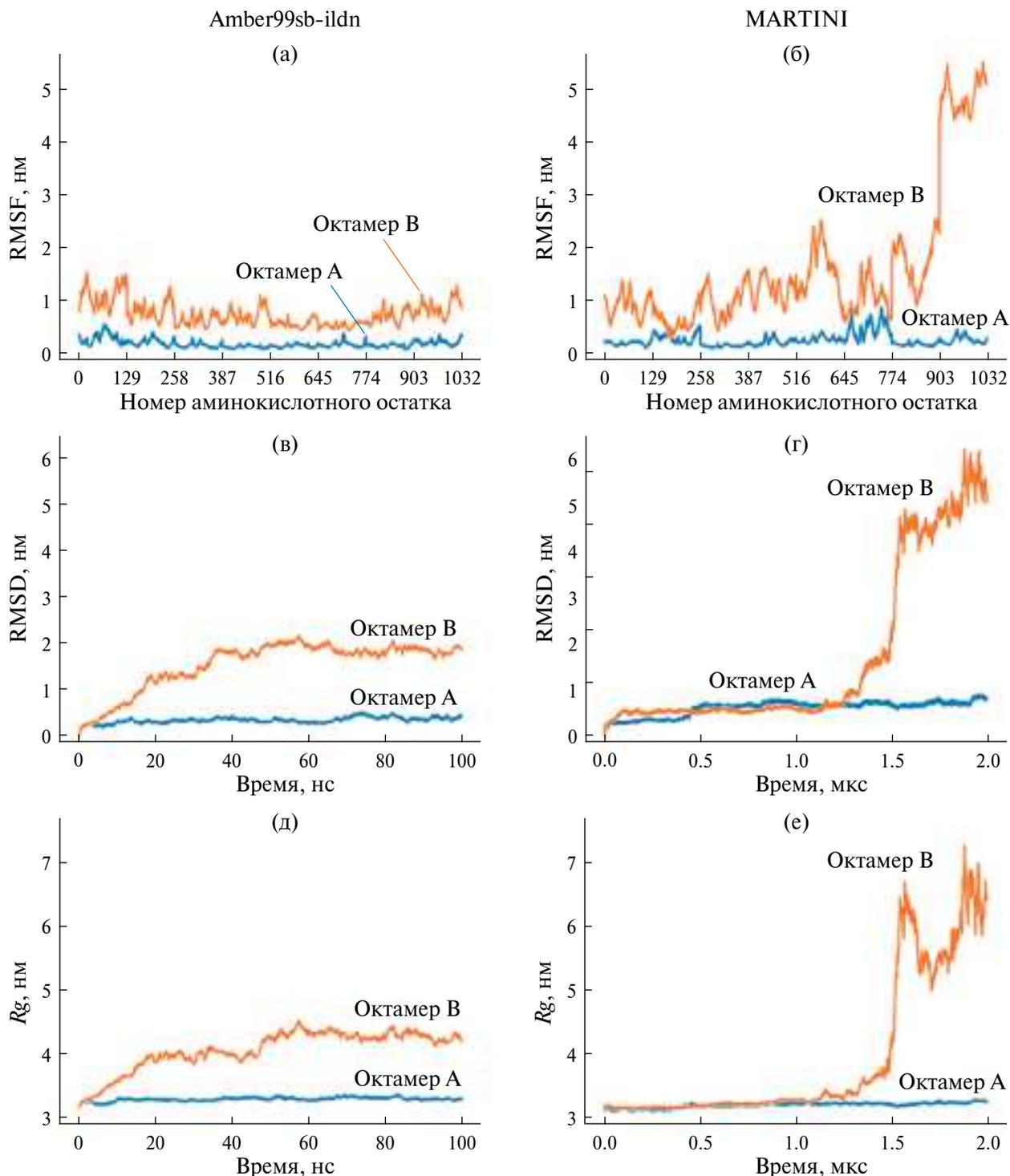


Рис. 3. Стабильность октамеров А и В в кристаллизационном растворе в ходе молекулярной динамики, смоделированной в разных силовых полях: “полноатомном” поле Amber99sb-ildn (слева) и крупнозернистом поле MARTINI (справа). Стабильность оценивалась с помощью характеристик RMSF (а, б), RMSD (в, г) и R_g (д, е). На всех графиках (а–е) октамер А стабильнее октамера В, что говорит о согласованности результатов моделирования в силовых полях Amber99sb-ildn и MARTINI.

номера остатков 904–1032 обладает крайне высокими значениями RMSF (больше 5 нм), что говорит о ее существенной нестабильности. Рисунок 2 указывает на то, что данная молекула полностью потеряла все связи с остальной частью октамера В.

При этом в случае поля Amber99sb-ildn в октамере В пропали связи только между некоторыми молекулами, хотя его форма изменилась существенно (рис. 2). Это отражено на рис. 3а, где видно, что все молекулы октамера В дестабилизированы в

одинаковой степени. В поле Amber99sb-ildn в конце моделирования (по истечении 100 нс) каждая из молекул октамера В связана либо с одной (в случае “концевых” молекул), либо с двумя другими молекулами (рис. 2). Разрыв связей между некоторыми молекулами в составе октамера В является однозначным подтверждением его нестабильности.

Различия в графиках RMSF октамера А в разных полях менее заметны (рис. 3а, 3б). В поле MARTINI молекулы, состоящие из а.о. с номерами 130–258 и 646–774, проявляют немного большую подвижность, при этом остальные значения RMSF флуктуируют вокруг одной величины (около 0.25 нм). В то же время в соответствии с рис. 2 структура октамера А заметно изменилась в MARTINI, хотя и осталась целой. Следует отметить, что в поле Amber99sb-ildn было смоделировано только 100 нс, а время жизни октамера А доподлинно не известно, поэтому данные, полученные с помощью разных полей, не противоречат друг другу.

Вероятно, октамер А в MARTINI претерпел наиболее значительные изменения (RMSD увеличилось почти в 2 раза) через 0.5 мкс после начала моделирования (рис. 3г), а затем (оставшиеся 1.5 мкс) трансформировался несущественно. Следовательно, его усредненное (по 2 мкс) положение, по выравниванию с которым рассчитывается RMSF, изменялось не очень заметно (рис. 3б). При попарном выравнивании начальной и конечной структур октамера А в обоих полях RMSD в крупнозернистом поле оказалось почти в 2 раза выше, чем в полноатомном (0.87 против 0.49 нм, рис. 2).

Октамер В в полноатомном поле начинает дестабилизироваться гораздо быстрее, чем в крупнозернистом. В поле Amber99sb-ildn изменения в структуре октамера В становятся существенными (RMSD достигает 2 нм) уже на 35 нс (рис. 3в), в то время как в MARTINI — только по истечении 1.5 мкс (рис. 3г). Однако трансформации октамера В заметнее в крупнозернистом поле, при котором максимальное значение RMSD составляет 6 нм (рис. 3г), что в 3 раза больше, чем в полноатомном поле (рис. 3в). Графики радиуса гирации октамера В имеют аналогичную зависимость (рис. 3д, 3е). В целом графики RMSD и R_g (рис. 3в–3е) указывают на то, что изменения в структуре октамера В в поле MARTINI происходят скачкообразно (в точке 1.5 мкс), а в Amber99sb-ildn — плавно. Значение RMSD, вычисленное путем попарного сравнения конечной и начальной структур октамера В, в крупнозернистом поле оказалось примерно в 2 раза больше, чем в полноатомном (4.18 против 1.9 нм, рис. 2).

Однако из рис. 3 следует, что по всем оценкам (RMSF, RMSD, R_g) октамер А демонстрирует большую стабильность по сравнению с октамером В в обоих силовых полях — Amber99sb-ildn и MARTINI, что также подтверждается изображениями структур октамеров в начале и в конце моделирования на рис. 2. При этом, несмотря на разные механизмы дестабилизации октамера В, для него

согласованность зависимостей RMSF, RMSD и R_g в обоих полях немного выше.

Таким образом, в целом результаты моделирования МД октамеров А и В с помощью полноатомного и крупнозернистого силовых полей согласуются. Несмотря на ряд различий в поведении октамеров белка в разных полях, они не влияют на справедливость данных, полученных с помощью MARTINI. В широком смысле это подтверждает применимость крупнозернистого силового поля MARTINI для изучения кристаллизационных растворов белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение результатов моделирования молекулярной динамики двух типов октамеров лизоцима (выделенных из кристаллической структуры лизоцима) в кристаллизационном растворе в силовых полях Amber99sb-ildn и MARTINI выявило, что октамер А стабильнее октамера В независимо от выбора поля. При этом известно, что октамер А в отличие от октамера В является кластером-прекурсором кристалла лизоцима. Согласованность данных, полученных при моделировании поведения октамеров с помощью обоих силовых полей, демонстрирует возможность использования поля MARTINI для исследования кристаллизационных растворов белков, в том числе установления кластеров-прекурсоров кристаллов белков.

В работе обнаружены и описаны различия в поведении октамеров в разных силовых полях. Полученные выводы могут помочь при выборе метода описания моделей (полноатомный или крупнозернистый) для конкретных исследовательских задач.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт” в части моделирования октамеров лизоцима в силовом поле MARTINI и Соглашения с Минобрнауки РФ от “12” октября 2021 г. № 075-15-2021-1362 (продолжение) в части обработки и анализа результатов компьютерного моделирования.

Работа была выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования “Комплекс моделирования и обработки данных исследовательских установок мега-класса” НИЦ “Курчатовский институт”, <http://ckp.nrcki.ru/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kovalchuk M.V., Blagov A.E., Dyakova Y.A. et al. // *Cryst. Growth Des.* 2016. V. 16. № 4. P. 1792. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01662>
2. Marchenkova M.A., Volkov V.V., Blagov A.E. et al. // *Crystallography Reports.* 2016. V. 61. № 1. P. 5. <https://doi.org/10.1134/S1063774516010144>
3. Boikova A.S., D'yakova Y.A., Il'ina K.B. et al. // *Crystallography Reports.* 2018. V. 63. № 6. P. 865. <https://doi.org/10.1134/S1063774518060068>

4. Kovalchuk M.V., Boikova A.S., Dyakova Y.A. et al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2019. V. 37. № 12. P. 3058. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1507839>.
5. Marchenkova M.A., Konarev P.V., Rakitina T.V. et al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* V. 38. № 10. P. 2939. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1649195>
6. Marchenkova M.A., Boikova A.S., Ilina K.B. et al. // *Acta Naturae.* 2023. V. 15. № 1. P. 58. <https://doi.org/10.32607/ACTANATURAE.11815>
7. Kordonskaya Y.V., Timofeev V.I., Dyakova Y.A. et al. // *Crystallography Reports.* 2018. V. 63. № 6. P. 947. <https://doi.org/10.1134/S1063774518060196>
8. Kordonskaya Y.V., Timofeev V.I., Marchenkova M.A., Konarev P.V. // *Crystals.* 2022. V. 12. № 4. P. 484. <https://www.mdpi.com/2073-4352/12/4/484>
9. Kordonskaya Y.V., Timofeev V.I., Dyakova Y.A. et al. // *Mend. Commun.* 2023. V. 33. № 2. P. 225. <https://doi.org/10.1016/J.MENCOM.2023.02.024>
10. Cerutti D.S., Le Trong I., Stenkamp R.E., Lybrand T.P. // *Biochemistry.* 2008. V. 47. № 46. P. 12065. <https://doi.org/10.1021/bi800894u>
11. Cerutti D.S., Le Trong I., Stenkamp R.E., Lybrand T.P. // *J. Phys. Chem. B.* 2009. V. 113. № 19. P. 6971. <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jp9010372>
12. Cerutti D.S., Freddolino P.L., Duke R.E., Case D.A. // *J. Phys. Chem. B.* 2010. V. 114. № 40. P. 12811. <https://doi.org/10.1021/jp105813j>
13. Taudt A., Arnold A., Pleiss J. // *Phys. Rev. E.* 2015. V. 91. № 3. P. 033311. <https://journals.aps.org/pre/abstract/10.1103/PhysRevE.91.033311>
14. Meinhold L., Merzel F., Smith J.C. // *Phys. Rev. Lett.* 2007. V. 99. № 13. P. 138101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.99.138101>
15. Marrink S.J., Periole X., Tieleman D.P., De Vries A.H. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010. V. 12. № 9. P. 225. <https://doi.org/10.1039/B915293H>
16. Marrink S.J., Risselada H.J., Yefimov S. et al. // *J. Phys. Chem. B.* 2007. V. 111. № 27. P. 7812. <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jp071097f>
17. Monticelli L., Kandasamy S.K., Periole X. et al. // *J. Chem. Theory Comput.* 2008. V. 4. № 5. P. 819. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ct700324x>
18. Marrink S.J., Monticelli L., Melo M.N. et al. // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2022. V. 13. № 1. P. e1620. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/wcms.1620>
19. Kroon P.C., Grünwald F., Barnoud J. et al. // 2022. <https://arxiv.org/abs/2212.01191v3>
20. Souza P.C.T., Alessandri R., Barnoud J. et al. // *Nature Methods.* 2021. V. 18. № 4. P. 382. <https://www.nature.com/articles/s41592-021-01098-3>
21. Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B. et al. // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. № 16. P. 1701. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
22. Wassenaar T.A., Ingólfsson H.I., Böckmann R.A. et al. // *J. Chem. Theory Comput.* 2015. V. 11. № 5. P. 2144. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jctc.5b00209>
23. Bernetti M., Bussi G. // *J. Chem. Phys.* 2020. V. 153. № 11. P. 114107. <https://doi.org/10.1063/5.0020514>
24. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., Van Gunsteren W.F. et al. // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. № 8. P. 3684. <https://doi.org/10.1063/1.448118>
25. Parrinello M., Rahman A. // *J. Chem. Phys.* 1982. V. 76. № 5. P. 2662. <https://doi.org/10.1063/1.443248>
26. Van Gunsteren W.F., Berendsen H.J.C. // *Mol. Simul.* 1988. V. 1. № 3. P. 173. <https://doi.org/10.1080/08927028808080941>
27. Hünenberger P.H., Van Gunsteren W.F. // *J. Chem. Phys.* 1998. V. 108. № 15. P. 6117. <https://doi.org/10.1063/1.476022>
28. Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. // *J. Comput. Chem.* 1997. V. 18. P. 1463. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)

APPLICABILITY OF THE MARTINI COARSE-GRAINED FORCE FIELD FOR SIMULATIONS OF PROTEIN OLIGOMERS IN CRYSTALLIZATION SOLUTION

© 2024 Y. V. Kordonskaya^{a,*}, V. I. Timofeev^{a,b}, M. A. Marchenkova^{a,b},
Y. V. Pisarevsky^b, Y. A. Dyakova^a, M. V. Kovalchuk^{a,b}

^aNational Research Centre "Kurchatov Institute," 123182 Moscow, Russia

^bShubnikov Institute of Crystallography of Kurchatov Complex of Crystallography and Photonics of NRC "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

*e-mail: yukord@mail.ru

Abstract. The molecular dynamics of two types of lysozyme octamers was simulated under crystallization conditions in the MARTINI coarse-grained force field. Comparative analysis of the obtained results with the simulation data for the same octamers modelled in the all-atom field Amber99sb-ildn showed that octamer "A" demonstrates greater stability compared to octamer "B" in both force fields. Thus, the results of molecular dynamics simulations of octamers using both force fields are consistent. Despite several differences in the behavior of the protein in different fields, they do not affect the validity of the data obtained using MARTINI. This confirms the applicability of the MARTINI force field for studying crystallization solutions of proteins.