

УДК: 577.353

Молекулярно-динамическая оценка механических свойств фибриллярного актина

Н. А. Кубасова^a, А. К. Цатурян^b

Институт механики МГУ,
Россия, 119192, Москва, Мичуринский проспект, д. 1

E-mail: ^a natalia@imec.msu.ru, ^b tsat@imec.msu.ru

Получено 27.06.2022, после доработки — 19.08.2022.

Принято к публикации 29.08.2022.

Актин — консервативный структурный белок, который экспрессируется в клетках всех эукариот. При полимеризации он образует длинные нити фибриллярного актина, или F-актина, которые участвуют в формировании цитоскелета, в мышечном сокращении и его регуляции, а также во многих других процессах. Динамические и механические свойства актина важны для взаимодействия с другими белками и реализации его многочисленных функций в клетке. Мы провели молекулярно-динамические (МД) расчеты сегмента актиновой нити, состоящего из 24 мономеров, в отсутствие и в присутствии MgADP, с явным учетом растворителя и при физиологической ионной силе при 300 К длительностью 204,8 нс в силовых полях AMBER99SB-ILDN и CHARMM36 в программной среде GROMACS, используя в качестве исходной структуры современные структурные модели, полученные методом криоэлектронной микроскопии высокого разрешения. МД-расчеты показали, что стационарный режим флуктуаций структуры длинного сегмента F-актина вырабатывается через 80–100 нс после начала МД-траектории. По результатам МД-расчетов оценили основные параметры спирали актина и ее изгибную, продольную и торсионную жесткости, используя участок расчетной модели, достаточно далеко отстоящий от ее концов. Оцененные значения шага (2,72–2,75 нм) и угла (165–168°) спирали F-актина, его изгибной ($2,8\text{--}4,7 \cdot 10^{-26}$ Н · м²), продольной ($36\text{--}47 \cdot 10^{-9}$ Н) и торсионной ($2,6\text{--}3,1 \cdot 10^{-26}$ Н · м²) жесткости хорошо согласуются с результатами наиболее надежных экспериментов. Результаты МД-расчетов показали, что современные структурные модели F-актина позволяют достаточно аккуратно описать его динамику и механические свойства при условии использования расчетных моделей, содержащих достаточно большое количество мономеров, современных силовых полей и относительно длинных МД-траекторий. Включение в МД-модели белков-партнеров актина, в частности тропомиозина и тропонина, может помочь понять молекулярные механизмы таких важных процессов, как регуляция мышечного сокращения.

Ключевые слова: F-актин, MgADP, математическое моделирование, молекулярная динамика, изгибная, продольная и торсионная жесткость

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант 22-24-00221.

UDC: 577.353

Molecular dynamics assessment of the mechanical properties of fibrillar actin

N. A. Koubassova^a, A. K. Tsaturyan^b

Institute of mechanics, Moscow State University,
1 Mitchurinsky pr., Moscow 119192, Russia

E-mail: ^a natalia@imec.msu.ru, ^b tsat@imec.msu.ru

Received 27.06.2022, after completion – 19.08.2022.

Accepted for publication 29.08.2022.

Actin is a conserved structural protein that is expressed in all eukaryotic cells. When polymerized, it forms long filaments of fibrillar actin, or F-actin, which are involved in the formation of the cytoskeleton, in muscle contraction and its regulation, and in many other processes. The dynamic and mechanical properties of actin are important for interaction with other proteins and the realization of its numerous functions in the cell. We performed 204.8 ns long molecular dynamics (MD) simulations of an actin filament segment consisting of 24 monomers in the absence and the presence of MgADP at 300 K in the presence of a solvent and at physiological ionic strength using the AMBER99SB-ILDN and CHARMM36 force fields in the GROMACS software environment, using modern structural models as the initial structure obtained by high-resolution cryoelectron microscopy. MD calculations have shown that the stationary regime of fluctuations in the structure of the F-actin long segment is developed 80–100 ns after the start of the MD trajectory. Based on the results of MD calculations, the main parameters of the actin helix and its bending, longitudinal, and torsional stiffness were estimated using a section of the calculation model that is far enough away from its ends. The estimated subunit axial (2.72–2.75 nm) and angular (165–168°) translation of the F-actin helix, its bending ($2.8\text{--}4.7 \cdot 10^{-26} \text{ N}\cdot\text{m}^2$), longitudinal ($36\text{--}47 \cdot 10^{-9} \text{ N}$), and torsional ($2.6\text{--}3.1 \cdot 10^{-26} \text{ N}\cdot\text{m}^2$) stiffness are in good agreement with the results of the most reliable experiments. The results of MD calculations have shown that modern structural models of F-actin make it possible to accurately describe its dynamics and mechanical properties, provided that computational models contain a sufficiently large number of monomers, modern force fields, and relatively long MD trajectories are used. The inclusion of actin partner proteins, in particular, tropomyosin and troponin, in the MD model can help to understand the molecular mechanisms of such important processes as the regulation of muscle contraction.

Keywords: F-actin, MgADP, mathematical modeling, molecular dynamics, flexural, longitudinal, and torsional stiffness

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2022, vol. 14, no. 5, pp. 1081–1092 (Russian).

This work was supported by grant 22-24-00221 of the Russian Science Foundation.

1. Введение

Актин — консервативный белок, который синтезируется во всех клетках эукариот. Мономер актина (глобулярный актин, или G-актин) содержит 375 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу ~42 кДа. В присутствии MgATP (MgATФ) G-актин обратимо полимеризуется и образует нити фибриллярного актина (F-актин). При этом каждый мономер взаимодействует с четырьмя соседними. Актин связывается со многими белками-партнерами и участвует в самых различных процессах, включая клеточную подвижность, внутриклеточный транспорт, формирование цитоскелета и др. [Pollard, Cooper, 2014; Reisler, Egelman, 2007]. Моторный белок миозин взаимодействует с актином и способен двигаться вдоль нитей F-актина или перемещать их, обеспечивая внутриклеточный транспорт и мышечное сокращение. Энергия для совершения механической работы выделяется в результате гидролиза MgATP. Миозин служит катализатором гидролиза, а его взаимодействие с актином ускоряет гидролиз на несколько порядков. Динамические и механические характеристики F-актина важны для его взаимодействия с белками-партнерами и реализации его биологических функций. Некоторые из этих характеристик были определены экспериментально с помощью различных подходов [Gittes et al., 1993; Kojima, Ishijima, Yanagida, 1994; Isambert et al., 1995; Tsuda et al., 1996; Prochniewicz et al., 2005; Tsaturyan et al., 2005; Nabiev et al., 2015]. Одним из методов оценки механических свойств G- и F-актина является молекулярно-динамическое (МД) моделирование [Chu, Voth, 2006; Pfaendtner et al., 2009; Pfaendtner et al., 2010; Matsushita et al., 2010; Fan, Saunders, Voth, 2012], которое позволило понять влияние нуклеотида (ADP или ATP) и конформации ДНК-связывающей петли актина (остатки 38–52) на механические свойства F-актина. Ранние МД-исследования были основаны на доступных в то время структурах актина [Holmes et al., 1990; Oda et al., 2009] и использовали имевшиеся в то время силовые поля (конкретный вид потенциала межатомного взаимодействия в белках). Кроме того, продолжительность МД-траектории в ранних работах была ограничена доступной в то время вычислительной мощностью, что не позволяло с уверенностью утверждать, что было достигнуто равновесие системы. Поэтому мы провели МД-моделирование F-актина в отсутствие и в присутствии MgADP (MgADФ) в давно используемом силовом поле AMBER99SB-ILDN и в относительно новом силовом поле CHARMM36 [Huang, MacKerell, 2013] с явным учетом растворителя. В данной работе мы использовали модель 24-мера актина, структура которого основана на недавних данных криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) и молекулярного моделирования [Yamada, Namba, Fujii, 2020; Pavadaı et al., 2020], и рассчитали траектории длительностью 204,8 нс для каждого варианта модели и силового поля. Из результатов расчетов были получены оценки величин механических характеристик F-актина: продольной, изгибной и крутильной жесткости, которые затем сравнили с экспериментальными данными.

2. Методика МД-расчетов

На основе опубликованной структуры F-актина в комплексе с тропомиозином и тропонином 6kn7.pdb [Yamada, Namba, Fujii, 2020] и уточненной модели F-актина с MgADP (дополнительные материалы к [Pavadaı et al., 2020]) был собран полимер, состоящий из 24 мономеров актина, включающий либо не включающий MgADP. МД-моделирование проводили в пакете GROMACS 2021.5 [Abraham et al., 2015] с использованием силовых полей AMBER99SB-ILDN или CHARMM36. Белок помещали в ячейку, имеющую форму прямоугольного параллелепипеда 9,5 × 9,9 × 70,3 нм, заполненную молекулами воды (модель TIP3P) с добавлением ионов Na⁺ и Cl⁻ для обеспечения электронейтральности системы и ионной силы 0,15 М. Размер ячейки выбирали так, чтобы расстояние от атомов белка до ее границ было не менее 1,5 нм; на границах ячейки были заданы периодические условия. Общий размер системы, включая молекулы воды,

составлял 1 159 020 атомов. Минимизацию энергии проводили методом наискорейшего спуска в два этапа. Первый этап проводили с гармоническими ограничениями, примененными к атомам белкового остова (N , C_α и C), до достижения максимальной силы $1000 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{нм}^{-1}$. На втором этапе ограничения снимали и минимизировали энергию, пока максимальная сила не становилась меньше $200 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{нм}^{-1}$. Затем систему уравнивали в NVT- и NPT-ансамбле до температуры 300 К и давления 1 атм, используя термостат Берендсена [Berendsen et al., 1984]. Длительность МД-траекторий составляла 204,8 нс с шагом 2 фс.

3. Обработка результатов МД-расчетов

Координаты всех атомов системы сохраняли каждые 200 пс, а затем использовали для дальнейшего анализа. На рис. 1 показана структура сегмента нити, включающего 24 мономера актина, которую использовали для МД-расчета. Для каждого момента времени i , т. е. «снимка» ($i = 0, \dots, 1024$), определяли радиус-вектор центра масс каждого из 24 мономеров актина ($j = 0, \dots, 23$). Чтобы избавиться от движений оси актиновой нити как твердого тела, для каждого момента времени методом наименьших квадратов определяли прямую, сумма квадратов расстояний от которой до центров масс мономеров минимальна. Затем применяли ко всей системе ортогональное преобразование, переводящее единичный вектор этой прямой в вектор $(0, 0, 1)$, после чего смещали всю систему вдоль оси z так, чтобы координата центра масс центров масс мономеров актина оказалась в начале координат. Изгиб оси актиновой нити относительно оси z определяли следующим образом. Методом наименьших квадратов находили параметры параболы $x_0^i, y_0^i, k_x^i, k_y^i$, минимизирующие функцию:

$$I^i(x_0^i, y_0^i, k_x^i, k_y^i) = \sum_{j=0}^{23} \left(\left(x_j^i - x_0^i - \frac{k_x^i (z_j^i)^2}{2} \right)^2 + \left(y_j^i - y_0^i - \frac{k_y^i (z_j^i)^2}{2} \right)^2 \right), \quad (1)$$

т. е. сумму квадратов расстояний от параболы до центров масс мономеров актина в трехмерном пространстве в момент времени i . Косинус угла между осью z и касательной к параболе на конце сегмента актиновой нити в момент времени i определяли по формуле

$$\cos(\alpha^i) = \sqrt{\frac{1}{1 + l^2((k_x^i)^2 + (k_y^i)^2)}}, \quad (2)$$

где l — расстояние от начала координат до конца сегмента актиновой нити. Полагая, что ось актиновой нити ведет себя как полужесткий нерастяжимый стержень (worm-like chain) с изгибной жесткостью K_b , и пользуясь соответствующей теорией [Flory, 1969], имеем

$$\langle \cos(\alpha) \rangle = \frac{\sum_{i=1}^{1024} \cos(\alpha^i)}{1024} = \exp\left(\frac{-l}{\xi}\right), \quad \xi = \frac{K_b}{k_B T}, \quad (3)$$

где k_B — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, ξ — персистентная длина. Поскольку, как показывают оценки (и подтвердили результаты расчетов), $l \ll \xi$, квадратичной аппроксимации (1) достаточно для оценки угла между осью нити и осью z .

Спираль актина определяется двумя параметрами: средним расстоянием d вдоль оси нити между центрами масс соседних мономеров и средним спиральным углом между соседними мономерами φ . По результатам МД-расчета в каждом кадре определяли d и φ , а по их флуктуациям оценивали продольную (K) и крутильную (G) жесткости нити. Здесь K — коэффициент пропорциональности между растягивающей силой и деформацией (относительным удлинением)

нити, а G — коэффициент пропорциональности между крутящим моментом и углом закручивания нити на единицу ее длины. Величины d и φ вычисляли только для мономеров с номерами $j = 2, \dots, 21$, чтобы уменьшить влияние концевых эффектов. Поскольку спиральный угол φ близок к π , на электронно-микроскопических снимках невысокого разрешения актиновая нить выглядит как двойная спираль с длинным периодом, равным удвоенному истинному периоду P актиновой спирали. Период спирали оценивали по формуле

$$P = d \frac{\pi}{\pi - \varphi}. \quad (4)$$

Величину l в формуле (2) определяли как $l = 11,5d$, поскольку осевое расстояние между центрами масс 0-го и 23-го мономеров равно $23d$.

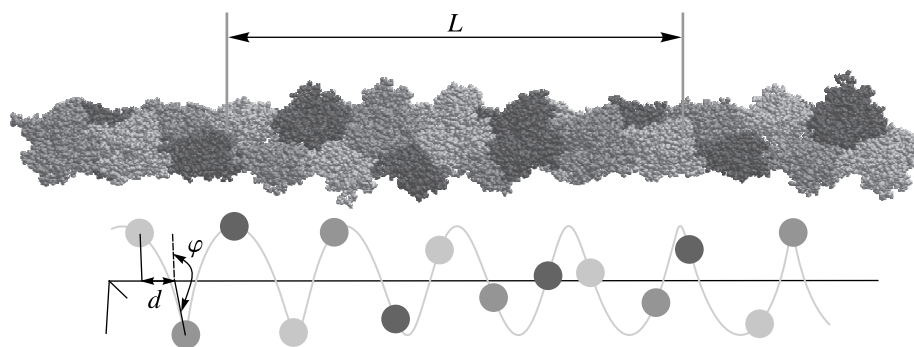


Рис. 1. Модель сегмента нити, образованного 24 мономерами актина (показаны разными градациями серого), которая была использована для МД-расчетов. Выделен участок нити длиной L , который использовали для оценки K и G . Внизу схематически показана спираль, образованная центрами масс 14 мономеров актина, на которой показаны основные параметры спирали: осевой шаг d и разница азимутальных углов соседних мономеров φ

Продольную и крутильную жесткости оценивали исходя из предположения, что средняя кинетическая и потенциальная энергия, приходящиеся на одну степень свободы броуновского движения системы, равна $\frac{k_B T}{2}$. Соответственно, в качестве степени свободы, связанной с растяжением нити, выбрали изменение осевого расстояния L между проекциями центров масс $j = 5, 6$ и $j = 18, 19$ пар мономеров актина на ось нити (рис. 1). Поскольку концы выбранного отрезка достаточно далеко отстоят от концов участка нити, использованного для МД-расчетов, такой подход позволяет избежать влияния концевых эффектов, а использование в качестве границ отрезка не одиночных мономеров, а пар соседних мономеров позволяет избавиться от высокоамплитудных броуновских колебаний на стыке мономеров. Отметим, что длина выбранного отрезка соответствовала 13 мономерам актина, что примерно равно периоду актиновой нити. Аналогично: крутильную жесткость оценивали по разности Ψ полусумм азимутальных углов центров масс 5-го и 6-го и 18-го и 19-го мономеров актина. Иными словами, одна степень свободы соответствовала однородному растяжению участка нити, содержащего 13 мономеров актина, а вторая — его однородному кручению. Таким образом, K и G оценивали из соотношений

$$K \frac{\langle \Delta L^2 \rangle_{\Delta t}}{2\langle L \rangle} = \frac{k_B T}{2}, \quad G \frac{\langle \Delta \Psi^2 \rangle_{\Delta t}}{2\langle L \rangle} = \frac{k_B T}{2}. \quad (5)$$

Здесь, как и прежде, угловые скобки обозначают осреднение по времени траектории, Δ — отклонение величины от ее среднего значения, а Δt — ширина скользящего временного окна, в котором определяли дисперсию соответствующей величины. Осреднение дисперсии длины L и разности азимутальных углов Ψ проводили для всей МД-траектории и отдельно для ее второй

половины, чтобы вычленил возможные эффекты начальных условий и установления стационарного режима тепловых флуктуаций.

4. Результаты

На рис. 2 показан временной ход изменения среднеквадратического отклонения C_α скелета от своего начального положения после удаления перемещений структуры как твердого тела (см. § 3) для каждой модели актиновой нити во время МД-траектории. Вычисленное таким образом отклонение характеризует изменение формы, т. е. деформации самой структуры.

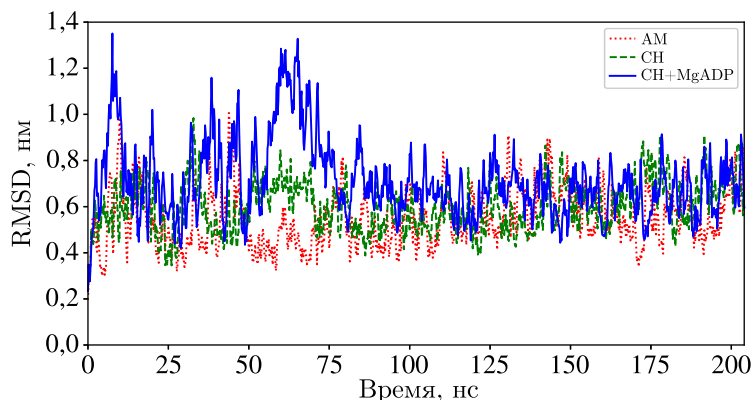


Рис. 2. Среднеквадратическое отклонение (RMSD) от начальной конфигурации во время МД-траектории после удаления твердотельных перемещений для трех моделей актиновой нити: AM — силовое поле AMBER99SB-ILDN в отсутствие MgADP (-MgADP), CH — силовое поле CHARMM36 (-MgADP), CH+MgADP — силовое поле CHARMM36 в присутствии MgADP (+MgADP)

Как видно из рис. 2, RMSD достигало стационарных значений через 80–100 нс после начала траектории. Эти данные показывают, что для установления динамического режима движения достаточно длинного фрагмента актиновой нити, который сколько-нибудь достоверно можно считать стационарным, необходимо по крайней мере 100 нс. На рис. 3 и 4 показан временной ход изменения некоторых характеристик нитей во время 204,8 нс траекторий МД-расчета для всех моделей F-актина.

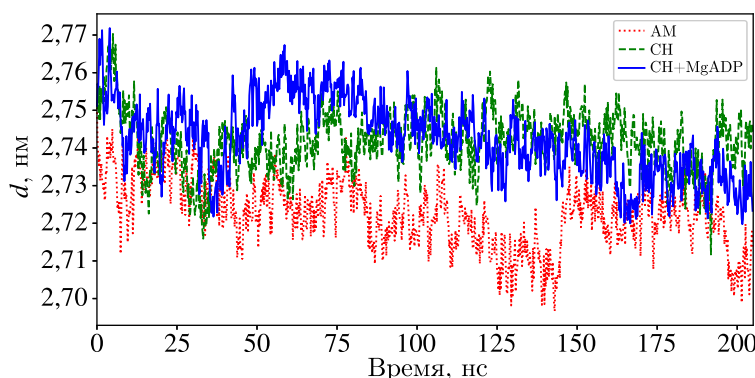


Рис. 3. Среднее расстояние d (нм) между проекциями центров масс соседних мономеров актина с номерами $j = 2, \dots, 21$ на ось нити во время МД-траектории продолжительностью 204,8 нс для трех моделей F-актина. Обозначения как на рис. 2

Видно, что через 80–100 нс после начала МД-траектории для всех моделей установился примерно равновесный процесс: средние значения осевого расстояния между мономерами

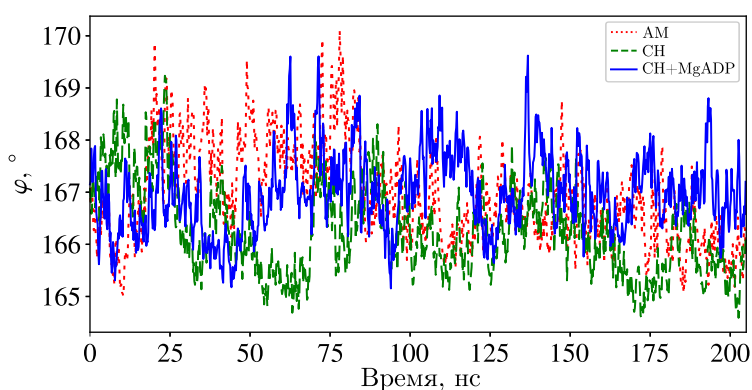


Рис. 4. Средняя разница азимутальных углов φ ($^{\circ}$) векторов нормалей к оси нити от центров масс соседних мономеров актина $j = 2, \dots, 21$ во время МД-траектории продолжительностью 204,8 нс для трех моделей F-актина. Обозначения как на рис. 2

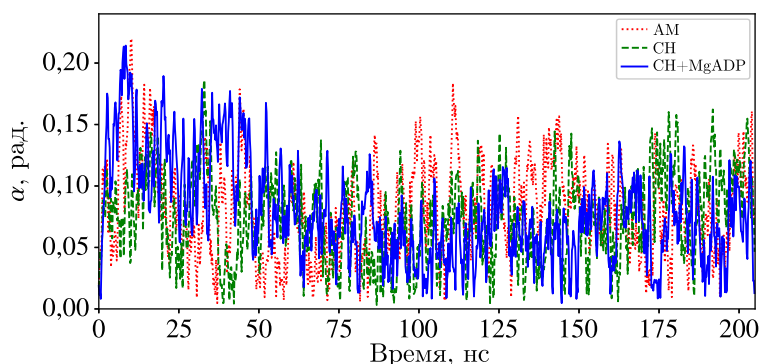


Рис. 5. Изменение угла α между осью актиновой нити и осью z во время МД-траектории продолжительностью 204,8 нс для моделей F-актина. Обозначения как на рис. 2

и спирального угла флуктуировали около равновесных значений, которые были различными для разных моделей (рис. 3, 4).

На рис. 5 показан временной ход изменения угла между осью актиновой нити и осью z , определенного по формуле (2). В отличие от параметров спирали актина изгибные флуктуации нити F-актина для всех моделей имели характер стационарного случайного процесса без видимых трендов (рис. 5). В таблице 1 приведены результаты обработки МД-траекторий в терминах спиральных параметров d , φ и основные макроскопические упругие параметры для каждой из моделей F-актина, оцененные в соответствии с методами, изложенными в § 3. RMSD (рис. 2), среднее осевое расстояние между соседними мономерами актина (рис. 3) и средний азимутальный угол между ними (рис. 4) имели заметный тренд в начале МД-траекторий. Поэтому продольную и крутильную жесткости оценивали по всей МД-траектории и по ее второй половине, усредняя осевые и угловые флуктуации в скользящем временном «окне» длительностью 16 нс. В таблице 1 приведены значения персистентной длины ξ , изгибной жесткости K_b , среднего осевого расстояния d , азимутального угла между мономерами φ , продольной (K) и торсионной (G) жесткости, а также периода спирали P для трех моделей. Чтобы оценить погрешность оценки параметров спирали актина и его механических свойств по результатам МД-моделирования, мы провели повторный расчет для модели F-актина с MgADP в силовом поле CHARMM36. Результаты обработки соответствующей МД-траектории также приведены в таблице 1.

Таблица 1. Основные результаты обработки результатов МД-расчетов

Модель актина, силовое поле	ξ , мкм	K_b , 10^{-26} Н · м ²	d^\dagger , нм	K^\dagger , 10^{-9} Н	φ^\dagger , °	G^\dagger , 10^{-26} Н · м ²	P , нм
AM	8,6	3,6	2,72 (2,72)	46,8 (48,2)	167,7 (167,6)	2,66 (2,85)	39,8 (39,5)
CH	11	4,7	2,74 (2,74)	45,7 (49,7)	166,1 (165,9)	2,61 (2,75)	35,5 (35,0)
CH+MgADP ¹	6,6	2,8	2,74 (2,74)	36,2 (35,0)	166,9 (167,1)	2,61 (3,10)	37,7 (38,2)
CH+MgADP ²	11	4,6	2,75 (2,75)	43,9 (40,3)	165,2 (165,1)	2,86 (2,83)	33,4 (33,2)

Обозначения AM, CH, CH+MgADP такие же, как на рис 2. Верхние индексы 1 и 2 у CH+MgADP соответствуют двум различным реализациям этого расчета. Приведены значения для всей траектории. У параметров с индексом \dagger в скобках приведены значения для второй половины траектории. K и G оценивали по среднему значению среднеквадратического отклонения L и Ψ в скользящем временном «окне» шириной 16 нс, как описано в § 3.

5. Обсуждение

Ограничения МД-метода, оценка собственных частот колебаний

Одним из наиболее существенных ограничений метода МД является относительно небольшая длительность расчетной траектории, особенно для больших систем, содержащих, как в нашем случае, более миллиона атомов. В связи с этим возникает вопрос о том, достаточно ли продолжительным был расчет, чтобы аккуратно оценить равновесные и динамические характеристики структуры. Для вытянутой периодической структуры актиновой нити грубые оценки собственных частот продольных, крутильных и изгибных колебаний можно получить из классической теории колебаний упругих стержней, предполагая для простоты, что механические свойства актиновой нити постоянны по ее длине, и используя наши оценки механических параметров, которые, как будет показано ниже, по порядкам величины совпали с доступными экспериментальными данными. Эта теория изложена, например, в [Ильюшин, Ленский, 1959].

Наименьшую частоту продольных колебаний f_{\parallel} можно оценить как $f_{\parallel} = \frac{v_{\parallel}}{4l}$, где l , как и прежде, — половина длины расчетного участка нити, $v_{\parallel} = \sqrt{\frac{K}{\rho}}$ — скорость продольных упругих волн, K и ρ — жесткость на растяжение и погонная плотность, т.е. масса, приходящаяся на единицу длины нити, соответственно. Подставляя среднее значение K , полученное из наших МД-расчетов $4 \cdot 10^{-8}$ Н, и $\rho = \frac{m_A}{d} \approx 2,56 \cdot 10^{-14}$ кг/м, где $m_A = 42$ кДа — масса мономера актина, а d , как и раньше, — расстояние между соседними мономерами вдоль оси нити, получаем $v_{\parallel} \approx 1250$ м/с и $f_{\parallel} \approx 10^{10}$ Гц, т.е. этот период примерно равен 0,1 нс.

Для крутильных колебаний скорость распространения волн — $v_0 = \sqrt{\frac{G}{J}}$, где G — крутильная жесткость, J — момент инерции относительно оси нити на единицу ее длины, а $f_0 = \frac{v_0}{4l}$ — наименьшая частота крутильных колебаний. Подставляя $G = 2,75 \cdot 10^{-26}$ Н · м² — значение, полученное в наших МД-расчетах, и $J = \rho r^2$, где $r \approx 2$ нм — средний радиус инерции актиновой нити, получаем $v_0 \approx 500$ м/с и, соответственно, $f_0 \approx 4 \cdot 10^9$ Гц.

Наконец, для изгибных колебаний упругого стержня, концы которого свободны от внешних сил и моментов, собственные частоты можно найти из уравнения $\cos(\beta) \operatorname{ch}(\beta) = 1$, где $\beta = 2l \left(\omega^2 \frac{\rho}{K_b} \right)^{1/4}$ — частотный параметр, $\omega = 2\pi f_{\perp}$ — угловая, а f_{\perp} — циклическая частота поперечных колебаний, K_b — изгибная жесткость стержня. Наименьшему корню этого уравнения $\beta \approx 4,73$ соответствует наименьшая частота изгибных колебаний $f_{\perp} \approx 9,4 \cdot 10^8$ Гц.

Таким образом, характерные наименьшие периоды собственных продольных, крутильных и поперечных колебаний сегмента актиновой нити, оцененные с помощью теории упругих стержней, существенно меньше длительности наших МД-расчетов (204,8 нс), что позволяет

предположить, что эта длительность была достаточной для получения надежных и достаточно точных оценок величин упругих характеристик актиновой нити. Тем не менее результаты повторного МД-расчета одной и той же структуры (табл. 1) показали существенный разброс оценок для K : $35\text{--}44 \cdot 10^{-9}$ Н, G : $2,6\text{--}3,1 \cdot 10^{-26}$ Н · м² и особенно K_b : $2,8\text{--}4,6 \cdot 10^{-26}$ Н · м². Если разброс значений продольной и крутильной жесткости был в пределах 20–25 %, что не превосходит разброса данных в соответствующих экспериментах, то различия значений изгибной жесткости достигали 67 %. Это обстоятельство показывает, что на кажущуюся изгибную жесткость, возможно, влияют какие-то медленные процессы, для выявления которых времени наших МД-расчетов было недостаточно. Нельзя исключить, что эти медленные процессы определяют так называемый полиморфизм актина — наличие нескольких устойчивых конформаций соседних мономеров актина, наблюдаемых с помощью криоэлектронной микроскопии [Galkin et al., 2010].

Параметры спирали актина

В пользу предположения о влиянии полиморфизма на характеристики F-актина свидетельствует различие значений спирального угла φ и периода P длинной спирали актина для двух МД-расчетов одной и той же структуры MgADP-актина (табл. 1). Полученные в результате МД-расчетов значения шага спирали актина d (2,72–2,75 нм) близки к их значениям, определенным по данным рентгенодифракционных измерений в интактной мышце [Huxley, Brown, 1967; Bordas et al., 1999]. Оценки периода P также были в пределах разброса измерений этой величины в рентгенодифракционных экспериментах с целыми мышцами и мышечными волокнами [Huxley, Brown, 1967; Bordas et al., 1999; Tsaturyan et al., 2005].

Изгибная жесткость и персистентная длина

Персистентная длина ξ для комплекса «F-актин–MgADP», определенная по результатам наших МД-расчетов: $\xi = 6,6\text{--}11$ мкм (табл. 1), оказалась сравнима с оценками, сделанными по данным электронной микроскопии: 8–9 мкм по данным [Isambert et al., 1995]. Еще большие значения длины $\xi = 16,7\text{--}19$ мкм для актин-фаллоидиновых нитей получили похожим методом авторы работ [Ott et al., 1993; Gittes et al., 1993], что и следовало ожидать, учитывая, что яд бледной поганки, фаллоидин, стабилизирует F-актин. С другой стороны, прямые измерения изгибной жесткости F-актина с помощью двухлучевой оптической ловушки (метод, оригинально предложенный в [Dupuis et al., 1997] и позднее развитый и усовершенствованный в [Nabiev et al., 2015]) дают для комплекса «F-актин–MgADP–фаллоидин» $K_b = 3,5 \cdot 10^{-26}$ Н · м², $\xi = 8,4$ мкм [Nabiev et al., 2015], что находится в пределах разброса полученных нами значений для F-актина без фаллоидина в силовом поле CHARMM36. Возможные причины расхождения значений, получаемых с помощью электронной микроскопии и прямыми измерениями, и потенциальные источники погрешностей каждого из этих методов получили подробное обсуждение в [Nabiev et al., 2015]. Таким образом, можно заключить, что оценки изгибной жесткости по МД-расчетам в современных силовых полях хорошо соответствуют данным прямых измерений. Отметим, что оценки персистентной длины, сделанные ранее по результатам расчетов с более короткими МД-траекториями с использованием моделей F-актина относительно низкого разрешения, которые были в распоряжении исследователей в то время, давали оценку, близкую к верхней границе полученных нами: от 8,2 мкм до 17,2 мкм в зависимости от выбранной модели [Pfaendtner et al., 2010] и ~ 10 мкм [Fan, Saunders, Voth, 2012] для MgADP–F-актина.

Продольная и торсионная жесткость

Полученная нами оценка продольной жесткости актиновой нити (от 36 до 47 Н · м² в зависимости от силового поля и модели F-актина (табл. 1)) находится в хорошем соответствии с результатами измерений с помощью микроигл [Kojima, Ishijima, Yanagida, 1994] и ранее опублико-

ванных МД-расчетов [Matsushita et al., 2010]. Отметим, что такая оценка согласуется с результатами механических экспериментов по измерению жесткости тонких актиновых нитей в мышечных волокнах [Linari et al., 1998] и экспериментов по измерению положения актиновых рентгеновских рефлексов на дифракционной диаграмме при растяжении мышечных волокон в состоянии ригора (состояние мышцы в отсутствие АТФ, в котором все миозиновые головки прочно связаны с актином) [Tsaturyan et al., 2005].

Наши оценки торсионной, или крутильной, жесткости актиновой нити ($2,6\text{--}3,1 \cdot 10^{-26} \text{ Н} \cdot \text{м}^2$) оказались несколько меньше, чем значения, полученные экспериментально, по измерению угловых флуктуаций микросферы, присоединенной к актиновой нити и удерживаемой оптической ловушкой ($8 \cdot 10^{-26} \text{ Н} \cdot \text{м}^2$, [Tsuda et al., 1996]), очень близки к оценке ($2,8 \cdot 10^{-26} \text{ Н} \cdot \text{м}^2$ [Yasuda, Miyata, Kinoshita, 1996]), также полученной с использованием микросфер и оптической ловушки для MgADP-F-актина, и при этом на порядок выше более поздней оценки ($0,23 \cdot 10^{-26} \text{ Н} \cdot \text{м}^2$), полученной по измерениям анизотропии флуоресценции метки, присоединенной к остатку Cys374 актина [Prochniewicz et al., 2005]. Отметим, что натяжение актиновой нити микросферой, удерживаемой оптической ловушкой, способствует увеличению ее кажущейся торсионной жесткости, в то время как подвижность метки по отношению к остатку Cys374 актина и подвижность самого С-концевого 374-го остатка по отношению к глобулярной части мономера актина неизбежно приводят к занижению оценки торсионной жесткости. С другой стороны, полученная нами оценка существенно выше, чем полученная авторами более ранних МД-исследований ($1,1 \cdot 10^{-26} \text{ Н} \cdot \text{м}^2$ [Matsushita et al., 2010], $0,47 \cdot 10^{-26} \text{ Н} \cdot \text{м}^2$ [Fan, Saunders, Voth, 2012]). Такое различие, по-видимому, обусловлено различием моделей F-актина и более короткими МД-траекториями в ранних работах.

Оценки продольной и торсионной жесткостей K и G по результатам МД-расчетов зависят от двух параметров: ширины скользящего «временного окна», в котором определяли дисперсию изменения длины и азимутального угла, и длины сегмента модели F-актина, используемого для оценки. Мы остановились на величине временного окна в 16 нс. Сужение или, наоборот, расширение этого интервала в 2 раза приводят к увеличению (снижению) кажущихся значений обеих жесткостей на 25–35%. С другой стороны, приближение границ участка нити, по флуктуациям длины и кручения которого оценивали K и G , к концам МД-модели приводило к снижению кажущихся значений жесткостей. Выбранный нами участок (рис. 1), содержащий 13 из 24 мономеров актина модели, представляется разумным компромиссом, поскольку позволяет избежать краевых эффектов, связанных с большей подвижностью концов модели, и к тому же его длина примерно равна периоду актиновой нити. Таким выбором, в частности, частично объясняется различие наших оценок от ранних результатов МД-моделирования, в которых были использованы более короткие модели F-актина и рассчитаны более короткие МД-траектории.

Выводы

Таким образом, сравнение оценки механических свойств актиновой нити по результатам МД-расчетов длительностью 204,8 нс с использованием современных силовых полей для модели, содержащей 24 мономера, показывает их хорошее соответствие при учете ограничений, присущих различным экспериментальным подходам, и при условии надлежащего выбора метода анализа МД-траекторий.

МД-расчеты показали, что использование нового силового поля CHARMM36 не дает преимуществ по сравнению с AMBER99SB-ILDN, а присутствие MgADP не влияет сколько-нибудь существенно на оценки механических параметров. Отметим, что для получения оценок, близких к результатам микроскопических и макроскопических экспериментов, необходимо использовать модели, содержащие достаточно много мономеров, и рассчитывать достаточно длинные МД-траектории (рис. 2–4), хотя, как показали наши контрольные расчеты, даже этого не достаточно

для получения репрезентативных оценок периода актиновой нити и ее изгибной жесткости. Тем не менее при выполнении вышеописанных условий модели F-актина, основанные на современных структурных данных, по-видимому, достаточно точны, чтобы их можно было использовать для МД-моделирования комплексов актина с другими белками, например с регуляторными белками поперечно-полосатых мышц, тропомиозином и тропонином, что необходимо для атомистического МД-моделирования регуляции мышечного сокращения и понимания молекулярных механизмов некоторых генетических миопатий и кардиомиопатий.

Список литературы (References)

- Ильюшин А. А., Ленский В. С.* Сопrotivление материалов. — М.: Физматлит, 1959. — 232 с.
Ilyushin A. A., Lensky V. S. Soprotivlenie materialov [Strength of materials]. — Moscow: Physmathlit, 1959. — 371 p. (in Russian).
- Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., Lindahl E.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX*. — 2015. — Vol. 1–2. — P. 19–25.
- Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., van Gunsteren W. F., DiNola A., Haak J. R.* Molecular-dynamics with coupling to an external bath // *J. of Chem. Phys.* — 1984. — Vol. 81. — P. 3684–3690.
- Bordas J., Svensson A., Rothery M., Lowy J., Diakun G. P., Boesecke P.* Extensibility and symmetry of actin filaments in contracting muscles // *Biophys. J.* — 1999. — Vol. 77. — P. 3197–3207.
- Chu J. W., Voth G. A.* Coarse-grained modeling of the actin filament derived from atomistic-scale simulations // *Biophys. J.* — 2006. — Vol. 90. — P. 1572–1582.
- Dupuis D. E., Guilford W. H., Wu J., Warshaw D. M.* Actin filament mechanics in the laser trap // *J. Muscle Res. Cell Motil.* — 1997. — Vol. 18. — P. 17–30.
- Fan J., Saunders M. G., Voth G. A.* Coarse-graining provides insights on the essential nature of heterogeneity in actin filaments // *Biophys. J.* — 2012. — Vol. 103. — P. 1334–1342.
- Flory P. J.* Statistical mechanics of chain molecules. — New York: Interscience Publishers, 1969. — 432 p.
- Galkin V. E., Orlova A., Schröder G. F., Egelman E. H.* Structural polymorphism in F-actin // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2010. — Vol. 17. — P. 1318–1323.
- Gittes F., Mickey B., Nettleton J., Howard J.* Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape // *J. Cell Biol.* — 1993. — Vol. 120. — P. 923–934.
- Holmes K. C., Popp D., Gebhard W., Kabsch W.* Atomic model of the actin filament // *Nature*. — 1990. — Vol. 457. — P. 441–445.
- Huang J., MacKerell Jr. A. D.* CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data // *J. Comput. Chem.* — 2013. — Vol. 34. — P. 2135–2145.
- Huxley H. E., Brown W.* The low-angle x-ray diagram of vertebrate striated muscle and its behaviour during contraction and rigor. // *J. Mol. Biol.* — 1967. — Vol. 30. — P. 383–434.
- Isambert H., Venier P., Maggs A. C., Fattoum A., Kassab R., Pantaloni D., Carlier M. F.* Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins // *J. Biol. Chem.* — 1995. — Vol. 270. — P. 11437–11444.
- Kojima H., Ishijima A., Yanagida T.* Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by in vitro nanomanipulation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1994. — Vol. 91. — P. 12962–12926.
- Linari M., Dobbie I., Reconditi M., Koubassova N., Irving M., Piazzesi G., Lombardi V.* The stiffness of skeletal muscle in isometric contraction and rigor: the fraction of myosin heads bound to actin // *Biophys. J.* — 1998. — Vol. 74. — P. 2459–2473.

- Matsushita S., Adachi T., Inoue Y., Hojo M., Sokabe M.* Evaluation of extensional and torsional stiffness of single actin filaments by molecular dynamics analysis // *J. Biomech.* — 2010. — Vol. 43. — P. 3162–3167.
- Nabiev S.R., Ovsyannikov D.A., Kopylova G.V., Shchepkin D.V., Matyushenko A.M., Koubassova N.A., Levitsky D.I., Tsaturyan A.K., Bershitsky S.Y.* Stabilizing the central part of tropomyosin increases the bending stiffness of the thin filament // *Biophys. J.* — 2015. — Vol. 109. — P. 373–379.
- Oda T., Iwasa M., Aihara T., Maéda Y., Narita A.* The nature of the globular- to fibrous-actin transition // *Nature* — 2009. — Vol. 457. — P. 441–445.
- Ott A., Magnasco M., Simon A., Libchaber A.* Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy // *Phys. Rev. E Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Topics.* — 1993. — Vol. 48. — P. R1642–R1645.
- Pavadai E., Lehman W., Rynkiewicz M.J.* Protein-protein docking reveals dynamic interactions of tropomyosin on actin filaments // *Biophys. J.* — 2020. — Vol. 119. — P. 75–86.
- Pfaendtner J., Branduardi D., Parrinello M., Pollard T.D., Voth G.A.* Nucleotide-dependent conformational states of actin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2009. — Vol. 106. — P. 12723–12728.
- Pfaendtner J., Lyman E., Pollard T.D., Voth G.A.* Structure and dynamics of the actin filament // *J. Mol. Biol.* — 2010. — Vol. 396. — P. 252–263.
- Pollard T.D., Cooper J.A.* Actin, a central player in cell shape and movement // *Science.* — 2014. — Vol. 326. — P. 1208–1212.
- Prochniewicz E., Janson N., Thomas D.D., De la Cruz E.M.* Cofilin increases the torsional flexibility and dynamics of actin filaments // *J. Mol. Biol.* — 2005. — Vol. 353. — P. 990–1000.
- Reisler E., Egelman E.H.* Actin structure and function: what we still do not understand // *J. Biol. Chem.* — 2007. — Vol. 282. — P. 36133–36137.
- Tsaturyan A.K., Koubassova N., Ferenczi M.A., Narayanan T., Roessle M., Bershitsky S.Y.* Strong binding of myosin heads stretches and twists the actin helix // *Biophys. J.* — 2005. — Vol. 88. — P. 1902–1910.
- Tsuda Y., Yasutake H., Ishijima A., Yanagida T.* Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion measured directly by in vitro micromanipulation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1996. — Vol. 93. — P. 12937–12942.
- Yamada Y., Namba K., Fujii T.* Cardiac muscle thin filament structures reveal calcium regulatory mechanism // *Nat. Commun.* — 2020. — Vol. 11. — P. 153.
- Yasuda R., Miyata H., Kinosita K.Jr.* Direct measurement of the torsional rigidity of single actin filaments // *J. Mol. Biol.* — 1996. — Vol. 263. — P. 227–236.