

# MODELOWANIE MOLEKULARNE BIAŁEK BŁONOWYCH

Aleksandra E. Dawid<sup>1</sup>, Michał Koliński<sup>2</sup>, Andrzej Koliński<sup>1</sup>,  
Sebastian Kmiecik<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Teorii Biopolimerów, Wydział Chemii,  
Uniwersytet Warszawski, ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa

<sup>2</sup>Pracownia Bioinformatyki, Instytut Medycyny Doświadczalnej i  
Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, ul. A. Pawińskiego 5, 02-106  
Warszawa

\*korespondencja: [sekmi@chem.uw.edu.pl](mailto:sekmi@chem.uw.edu.pl)

**Hasła do zapamiętania:** modelowanie wieloskalowe, modelowanie  
gruboziarniste, dynamika molekularna, model CABS, receptory GPCR

## 1. Wstęp

Jednym z głównych celów współczesnych badań biomedycznych jest zrozumienie na poziomie molekularnym podstawowych procesów odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie organizmu, a także zachodzących w nim procesów chorobotwórczych. Kluczowym elementem wielu takich mechanizmów są białka błonowe (związane ze strukturą błon biologicznych). Szacuje się, że ponad 60% celów dla nowych leków to białka błonowe [1]. Ich zróżnicowana funkcjonalność przejawia się w wielu aspektach życia komórkowego: utrzymują stabilność strukturalną komórek, stanowią ważny element kaskad sygnalizacyjnych jako receptory błonowe, wykazują aktywność katalityczną występując w roli enzymów, są odpowiedzialne za transport molekularny małych cząsteczek przez błonę lipidową jako kanały, transportery oraz pompy jonowe. Na szczególną uwagę zasługuje rodzina A podobnych do rodopsyny (ang. *rhodopsin-like*) receptorów błonowych

sprzężonych z białkami G (GPCR – ang. *G protein-coupled receptors*), odpowiedzialnych między innymi za kontrolę odczuwania bólu (receptory opioidowe), ciśnienia tętniczego (receptory adrenergiczne), proces widzenia (rodopsyna), czy odczuwanie smaku i zapachu. Ich wspólną funkcją jest przekazywanie oraz wzmacnianie specyficznych sygnałów docierających do wnętrza komórki z jej otoczenia. Mechanizm tego procesu rozpoczyna się od związania cząsteczki sygnałowej (liganda) przez zewnątrzkomórkową domenę receptora. Prowadzi to do zmian konformacyjnych w strukturze receptora umożliwiających wiązanie białek G po wewnętrznej stronie błony oraz ich aktywację. Aktywowane białka G mogą następnie przekazać sygnał do dalszych białek efektorowych zlokalizowanych we wnętrzu komórki, a tym samym zainicjować skomplikowane kaskady sygnalizacyjne. Pojedynczy receptor może aktywować wiele białek G co prowadzi do znacznego wzmocnienia przekazywanego sygnału. Wszelkie nieprawidłowości występujące na dowolnym etapie przekazywania sygnału mogą doprowadzić do zaburzenia fizjologii oraz inicjacji procesów chorobotwórczych [2, 3]. Aby im przeciwdziałać, niezwykle pomocna jest znajomość mechanizmu działania danego receptora na poziomie molekularnym. Oznacza to konieczność znajomości struktury receptora (z dokładnością do położenia poszczególnych atomów), co jest pierwszym etapem w drodze do zrozumienia mechanizmu przeniesienia sygnału oraz stanowi punkt wyjściowy do projektowania nowych, bardziej skutecznych leków, które będą selektywne względem danego typu receptora.

W porównaniu do białek globularnych, eksperymentalne otrzymywanie struktury białek błonowych jest dużo bardziej skomplikowanym zadaniem, często niewykonalnym przy obecnym stanie wiedzy. Jest to spowodowane problemami pojawiającymi się podczas procesu krystalizacji białek błonowych (duża powierzchnia hydrofobowa, środowisko błony, niestabilność konformacyjna, niski poziom ekspresji) [4, 5]. Pomimo, że białka błonowe stanowią około jedną trzecią wszystkich białek obecnych w ludzkim genomie [6], zaledwie około 1% znanych struktur przestrzennych białek należy do przedstawicieli tej rodziny. Nieliczne, dostępne struktury krystalograficzne otrzymane w specyficznych warunkach (bez błony biologicznej) są niezwykle pomocne w badaniach mechanizmu działania tych białek. Biorąc pod uwagę ograniczenia metod eksperymentalnych oraz ogromne znaczenie białek błonowych dla przemysłu farmakologicznego, zastosowanie metod teoretycznych do badania ich struktury, dynamiki i funkcji jest bardzo obiecującą alternatywą.

## 2. Zastosowanie metod teoretycznych w badaniu białek błonowych na przykładzie receptorów GPCR

W ostatnich latach można zaobserwować rosnące zainteresowanie zastosowaniem metod teoretycznych do przewidywania struktury, funkcji i mechanizmów działania receptorów GPCR [7, 8].

Rezultaty ogólnoświatowego konkursu w przewidywaniu struktury kompleksów receptorów GPCR z ligandami (World-Wide Competition in Structure Prediction of GPCR-ligand complexes) [9], zorganizowanego w 2008 i 2010 roku, pokazują, że metody obliczeniowe uwzględniające dostępne dane doświadczalne (różnego rodzaju) mogą okazać się skuteczne w wyznaczeniu struktury receptora oraz identyfikacji kluczowych oddziaływań receptor-ligand. Niestety, żadna z prezentowanych metod nie była w stanie przeprowadzić szybkiego i dokładnego próbkowania przestrzeni konformacyjnej kompleksu receptora z ligandem co nie pozwala jeszcze zastosować tych metod z powodzeniem na skalę przemysłową.

Oprócz modelowania oddziaływań receptorów GPCR z ligandami, metody teoretyczne znajdują również zastosowanie w przewidywaniu struktury samego receptora. Podstawowym zagadnieniem jest prawidłowe przewidzenie konformacji pętli zewnątrzkomórkowych, a zwłaszcza konformacji najdłuższej drugiej pętli zewnątrzkomórkowej, przykrywającej miejsce wiążące receptora. Pętle te są najbardziej zróżnicowane pod względem sekwencyjnym i strukturalnym u wszystkich przedstawicieli rodziny A receptorów GPCR. Znajomość struktury pętli jest kluczowa dla identyfikacji nowych ligandów [10] z wykorzystaniem modelu przestrzennego danego receptora, jak i również dla dokładności dokowania pojedynczego liganda i dokowania przesiewowego (ang. *Virtual Ligand Screening - VLS*).

W odniesieniu do poprzedniego okresu, w ciągu ostatnich kilku lat nastąpił dramatyczny wzrost liczby nowych struktur receptorów GPCR o wysokiej rozdzielczości (np. receptorów: *B2-adrenergicznego* [11], *A<sub>2A</sub>-adenozynowego* [12], *B1-adrenergicznego* [13], *D3 dopaminowego* [14], *chemokin* [15]). Ocenia się, że ten gwałtowny przyrost nowych danych eksperymentalnych, stanowiących punkt wyjścia dla technik modelowania molekularnego, to szansa dla metod komputerowych na przejęcie wiodącej roli w badaniach nad receptorami GPCR [16]. Jak do tej pory, symulacje dynamiki molekularnej stały się znaczącym narzędziem w badaniach z zakresu biofizyki receptorów GPCR [16], umożliwiając postęp w zrozumieniu oddziaływań receptor-ligand, mechanizmów aktywacji oraz roli wody i lipidów w mechanizmach funkcjonowania tych receptorów. Biorąc pod uwagę, że liczba nowych struktur wyznaczonych metodami eksperymentalnymi będzie się zwiększać, jak również będzie wzrastać moc obliczeniowa komputerów, należy

przypuszczać, że metody komputerowe będą odgrywały coraz większą rolę w badaniach receptorów GPCR, jak i innych białek błonowych.

### 3. Pełno-atomowa Dynamika Molekularna

Pełno-atomowa dynamika molekularna jest obecnie uznawana za podstawową technikę symulacji używaną do badania funkcji i mechanizmu działania białek błonowych na podstawie danych doświadczalnych [1]. Głównym ograniczeniem tej techniki jest jej duży koszt obliczeniowy. Współczesne możliwości superkomputerów często nie pozwalają się nawet zbliżyć do skal czasowych w jakich zachodzą ważne procesy biologiczne. Kolejnym problemem w zastosowaniu do białek błonowych jest duży rozmiar badanych układów (zawierających oprócz białka także fragment błony biologicznej oraz cząsteczki wody), co dodatkowo zwiększa koszt obliczeń.

Obecnie, dzięki wykorzystaniu najnowszych superkomputerów dedykowanych do obliczeń pełno-atomowej dynamiki molekularnej, dla układu GPCR/błona/woda możliwe jest osiągnięcie skali czasowej rzędu mikrosekund. Spektakularnym przykładem wykorzystania tak długich symulacji było ostatnio prześledzenie mechanizmu wiązania leków przez receptory  $\beta$ 1- i  $\beta$ 2-adrenergiczne [17]. Symulacjom poddano dwie struktury krystalograficzne pozbawione związanych agonistów obecnych w strukturach krystalicznych, odpowiednio 2VT4 dla  $\beta$ 1-adrenergicznego [13] i 2RH1 dla  $\beta$ 2-adrenergicznego [11]. Receptory umieszczono w modelu błony komórkowej POPC w środowisku wodnym z dodatkiem jonów. Symulacje przeprowadzono oddzielnie dla czterech ligandów, trzech antagonistów i jednego agonisty. Cząsteczki te są typowymi obecnie stosowanymi lekami adrenergicznymi. W celu zbadania sposobów wiązania się każdego z czterech ligandów, na początku każdej symulacji dodano po 10 ligandów jednego typu tak aby znajdowały się w odległości niemniejszej niż 30 Å od miejsca wiążącego białka. W wyniku przeprowadzenia 82 symulacji, z których każda trwała średnio od 1  $\mu$ s do 19  $\mu$ s, odnotowano 21 przypadków spontanicznego tworzenia się kompleksów receptor-ligand. Co ciekawe, w każdym z zaobserwowanych przypadków powstałe kompleksy były stabilne i żaden ligand nie opuścił miejsca wiążącego do końca trwania symulacji. Zarejestrowane wartości energii wiązania były zbieżne z wynikami eksperymentalnymi. Dodatkowo, analiza zebranych trajektorii pozwoliła na zbadanie mechanizmu wnikania liganda do miejsca wiążącego receptora, które znajduje się we wnęce tworzonej przez siedem  $\alpha$ -helis transbłonowych białka. Na uwagę zasługuje również fakt, że niektóre z otrzymanych kompleksów były niemal identyczne z ich znanymi strukturami krystalograficznymi (porównanie struktury zadokowanego alprenololu z jego dostępną strukturą krystalograficzną wykazało średnią wartość RMSD na poziomie jedynie 0.8 Å dla ciężkich atomów liganda). Wyniki powyższych symulacji, oraz ich zgodność z danymi eksperymentalnymi, są dowodem na

skuteczność pełno-atomowej dynamiki molekularnej w badaniu dynamiki procesów biologicznych, które nie są dostępne dla obecnie stosowanych metod eksperymentalnych.

#### 4. Modele zredukowane (gruboziarniste)

Modele zredukowane (gruboziarniste, *ang. coarse-grained*) wykorzystują zredukowaną (uproszczoną) reprezentację atomowej struktury badanej makromolekuły (w przypadku białek błonowych używany jest zredukowany model białka oraz uproszczony model cząsteczek lipidów tworzących błonę komórkową). Zredukowana reprezentacja może być zdefiniowana na wiele sposobów: niektóre atomy zostają zupełnie pominięte, inne zaś łączone są w grupy, a następnie zostają zastąpione równoważnym atomem zjednoczonym (pseudo-atomem). Zabieg ten wprowadza znaczące uproszczenie modelowanego układu (zmniejszenie liczby stopni swobody), co znacznie obniża koszt obliczeń. W przypadku symulacji metodą dynamiki molekularnej wykorzystanie atomów zjednoczonych pozwala na wydłużenie kroku symulacji – przykładowo: zamiast 2 femtosekundowego kroku, stosowanego w symulacjach pełno-atomowych, można zastosować krok 40 femtosekundowy, co pozwala na osiągnięcie znacznie większych skal czasowych. Konsekwencją zastosowanego przybliżenia jest niższa rozdzielczość otrzymywanych wyników i większy margines błędu w ocenie energetycznej otrzymywanych konformacji.

Odpowiednio zaprojektowane zredukowane modele makromolekuł umożliwiają analizę dynamiki układów dużej skali (zarówno pod względem liczby atomów jak i czasu trwania symulacji) [18].

Symulacje w oparciu o modele zredukowane znalazły wiele zastosowań w modelowaniu białek błonowych, między innymi do: symulacji dużych kompleksów i oligomerów [19], przewidywania struktury przestrzennej białek [20], modelowania dwu-warstwy lipidowej [21], badania interakcji białkowo-lipidowych [22, 23], symulacji umieszczania białek w błonie [21], symulacji oligomeryzacji domen transbłonowych [24], szacowania energii swobodnej dimeryzacji [21, 25, 26], a także poznania mechanizmów aktywacji, przewodzenia sygnału czy transportu jonów przez kanały [27] oraz wody przez akwaporyny [28]. Symulacje bazujące na modelach gruboziarnistych są również używane do lokalizowania specyficznych miejsc wiązania ligandów, wyznaczania aktywnej konformacji oraz jako narzędzie wspierające projektowanie leków.

Jedną z najwydajniejszych i prawdopodobnie najbardziej uznanych metod stanowi gruboziarnista Dynamika Molekularna realizowana w polu siłowym MARTINI [29]. Zredukowana reprezentacja przyjęta przez tą metodę daje szansę zbadania układów dużej skali, tzn. systemów składających się z ponad 500 000 atomów oraz procesów wymagających skal czasowych przekraczających 100 mikrosekund. Tą metodą zbadano między innymi

mechanizm asocjacji glikoforyny A [21] oraz oszacowano profil energetyczny dimeru rodopsyny [19].

## 5. Modelowanie wieloskalowe

Modelowanie wieloskalowe polega na przewidywaniu właściwości badanych układów w oparciu o modelowanie w różnych skalach, w szczególności w różnych skalach reprezentacji (rozdzielczości) i czasowych [30]. Schemat przykładowej procedury symulacji wieloskalowej w oparciu o zredukowany model CABS (bardziej szczegółowy schemat przedstawiony jest na Rys. 1):

- symulacja w skali zredukowanej za pomocą rozszerzonego modelu CABS (umożliwiająca charakterystykę zmian struktury białek, która zachodzi w dużych skalach czasowych - niedostępnych dla pełno-atomowej dynamiki molekularnej).
- odbudowa wybranych modeli z reprezentacji zredukowanej do pełno-atomowej [31].
- zastosowanie różnych technik pełno-atomowej dynamiki molekularnej do odbudowanych modeli w celu optymalizacji struktury, oceny jakości otrzymanych modeli [32] lub też kontynuacji symulacji dynamiki (w celu otrzymania charakterystyki zmian struktury białek, która zachodzi w małych skalach czasowych).

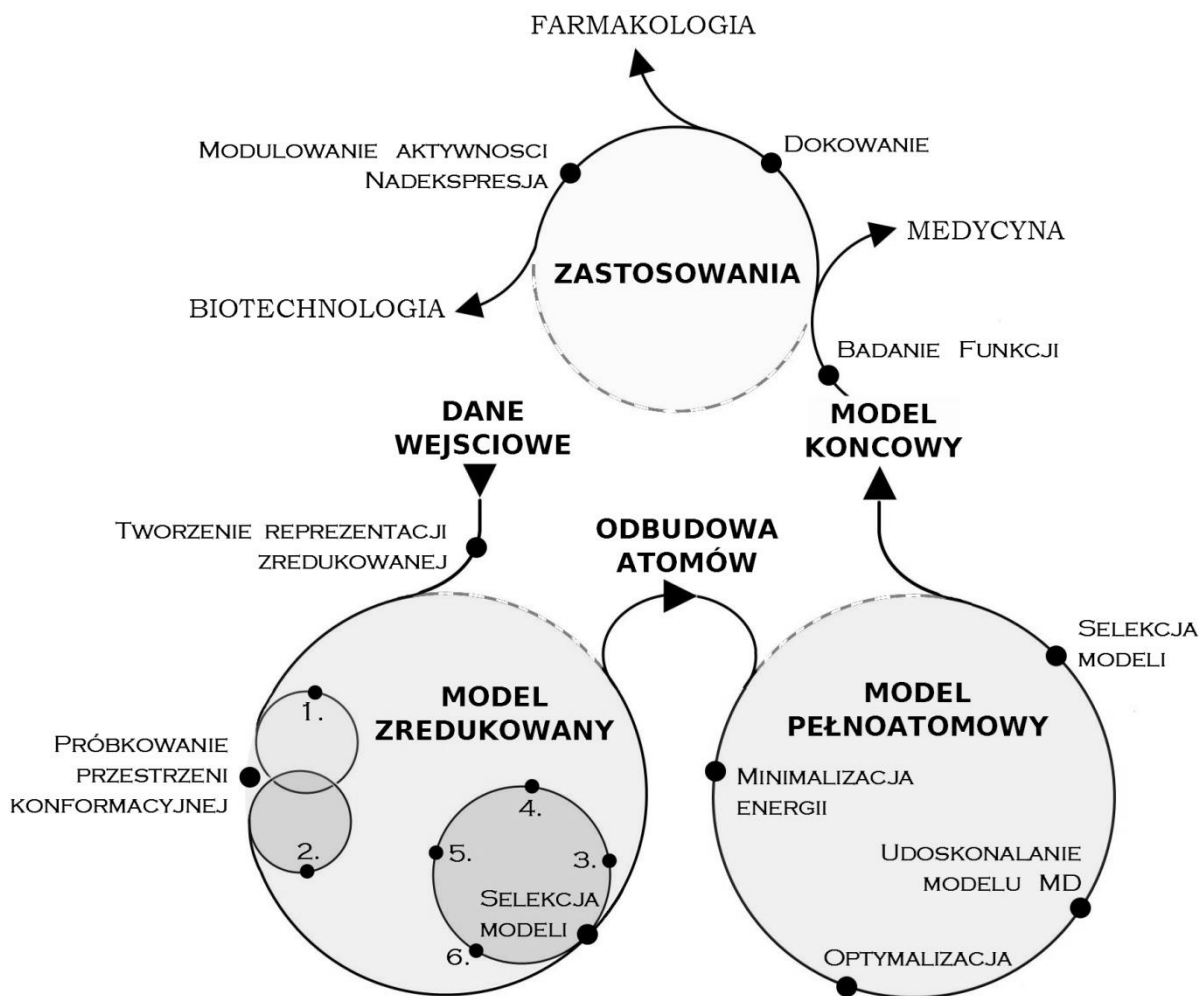
Opisane w ostatnich latach liczne przykłady modelowania wieloskalowego białek i ich kompleksów [33] pokazują, że takie podejście ma duży potencjał w rozszerzaniu dostępnych dla symulacji skal czasowych i rozmiarów badanych układów, również w przypadku białek błonowych (przykłady wieloskalowego modelowania przy użyciu modelu CABS przedstawione są w następnej sekcji rozdziału).

Jednym z interesujących przykładów zastosowania modelowania wieloskalowego było zbadanie mechanizmu powstania heterodimeru helis  $\alpha/\beta$  TM integryny w modelu błony DPPC [34]. W tym przypadku etap niskiej rozdzielczości, oparty na wydajnej dynamice molekularnej w zredukowanej reprezentacji [35], umożliwił automatyczne wykonanie licznych symulacji samoorganizacji helis oraz analizę statystyczną na reprezentatywnym zespole około 100 struktur. Zazwyczaj pełne uformowanie dimeru następowało w trakcie pierwszych kilkuset nanosekund symulacji. Otrzymane kompleksy poddano szczegółowej ocenie w symulacjach Dynamiki Molekularnej na poziomie pełno-atomowym. Ostateczne wyniki okazały się być zgodne z danymi eksperymentalnymi.

W innym ciekawym przypadku modelowanie wieloskalowe posłużyło do przewidywania specyficznych miejsc wiązania lipidów na powierzchni białka:

dokowania difosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP2) do kanału błonowego odpowiedzialnego za czynny transport jonów  $K^+$  (KIR) [36]. Uzyskane w symulacjach wyniki zostały w ostatnim czasie potwierdzone strukturami krystalograficznymi Kir2.2 ze związaną cząsteczką PIP2 [37].

## SCHEMAT MODELOWANIA WIELOSKALOWEGO



**Rys. 1.** Schemat przedstawia przykładowe etapy modelowania wieloskalowego. Przedstawione modelowanie składa się z 2 głównych etapów. Pierwszy z nich stanowi modelowanie w reprezentacji zredukowanej (np. przy użyciu modelu CABS). Po wytypowaniu najlepszych otrzymanych modeli następuje odbudowa szczegółów atomowych, a dalsze symulacje prowadzone są w modelu pełno-atomowym. Otrzymany końcowy model charakteryzuje się wysoką rozdzielczością, dzięki czemu nadaje się do wielu zastosowań (przy założeniu, że wynik jest poprawny). Oznaczenia cyfr na rysunku: 1 – próbkowanie lokalne (pętle, krótkie brakujące fragmenty); 2 – próbkowanie globalne; 3 – grupowanie modeli wg ich podobieństwa strukturalnego (*ang. clustering*); 4 – analiza skupień; 5 – dodatkowa ocena modeli (*ang. scoring*); 6 – wybór najlepszego modelu.

## 5.1 Przykłady zastosowania modelu CABS do wieloskalowych symulacji białek błonowych

Rozwijany i wykorzystywany przez autorów zredukowany model CABS [18] znalazł wiele zastosowań w przewidywaniu struktury przestrzennej białek globularnych [18, 38], modelowania kompleksów białkowych [39] oraz dynamiki białek [30, 40-44]. Przedstawione poniżej przykłady zastosowania modelu CABS do wieloskalowego modelowania białek błonowych ograniczają się do symulacji ich poza-błonowych części, podczas gdy części transbłonowe pozostają unieruchomione (obecnie trwają prace nad rozszerzeniem modelu CABS o uproszczony model błony biologicznej).

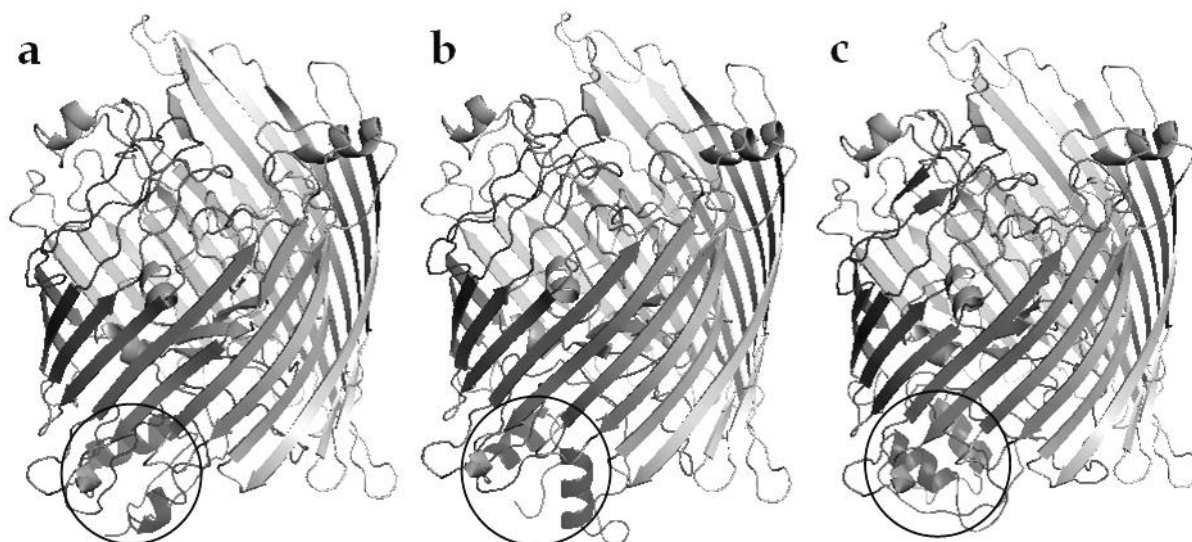
Model CABS znalazł zastosowanie do przewidywania struktury i dynamiki dużego białka błonowego – transportera FecA [45]. Transporter FecA pełni kluczową rolę w procesach transportu oraz sygnałowych związanych z przyswajaniem żelaza. Białko FecA zbudowane jest z trzech połączonych ze sobą domen tzw.: „beczki”, „wtyczki”, oraz domeny przy końcu N. Domena „beczka” to zanurzony w błonie biologicznej cylinder, składający się głównie z beta-wstęg. Domena „wtyczka” umiejscowiona jest wewnątrz cylindra i pełni rolę bariery pomiędzy zewnętrznym i wewnętrznym środowiskiem błony oraz służy jako przenośnik molekuł żelaza. Domena przy końcu N pełni rolę łącznika z innymi ważnymi dla funkcji FecA białkami.

Do poznania mechanizmu działania FecA potrzebna jest znajomość jego pełnej struktury. Wcześniej, metodą krystalografii otrzymano jedynie strukturę połączonych domen „beczki” i „wtyczki” bez domeny przy końcu N, której struktura została otrzymana osobno metodą NMR. Zastosowanie zredukowanego modelu CABS pozwoliło na wydajne symulacje struktury, a w szczególności rodzaju oddziaływań, trzech połączonych domen co nie byłoby możliwe klasycznymi metodami symulacji ze względu na zbyt duży rozmiar układu (741 reszt aminokwasowych). Procedura modelowania składała się z kilku kroków. Pierwszym z nich było wygenerowanie struktury startowej na podstawie eksperymentalnie otrzymanej struktury domen „beczki” i „wtyczki” podczas gdy domena przy końcu N została dodana do reszty struktury jako łańcuch losowy. Podczas symulacji, większość reszt aminokwasowych domen „beczki” i „wtyczki” pozostało zamrożonych w położeniach struktury eksperymentalnej, podczas gdy na większość reszt domeny przy końcu N nałożono miękkie więzy otrzymane z jej struktury eksperymentalnej. Otrzymana trajektoria została poddana analizie skupień [46], a następnie wybrane modele zostały odbudowane do reprezentacji pełno-atomowej i zoptymalizowane w pełno-atomowym polu siłowym [31, 32].

Analiza otrzymanych modeli wykazała obecność dwóch dominujących konformacji, które w trakcie symulacji często przechodziły jedna w drugą (wyróżnione na Rys. 2 jako a i b). Pozostałe konformacje wyróżnione w analizie



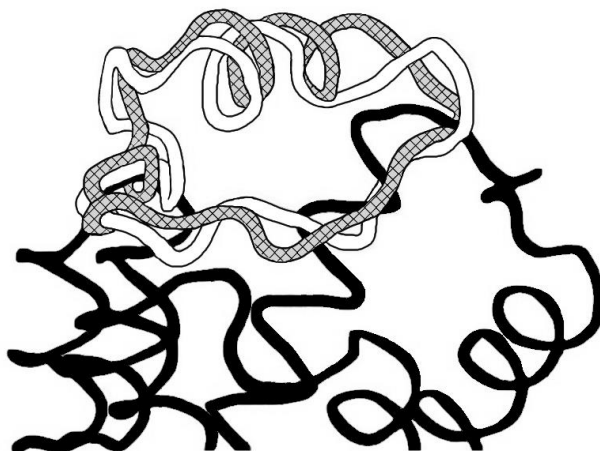
skupień okazały się być znacznie mniej liczne oraz mniej korzystne energetycznie (przykładowa konformacja została oznaczona jako c na Rys. 2). Otrzymane w trakcie symulacji modele posłużyły do zaproponowania nowej hipotezy tłumaczącej funkcjonowanie FecA, oraz stanowią materiał do przyszłej weryfikacji metodami eksperymentalnymi.



**Rys. 2.** Reprezentatywne struktury białka FecA otrzymane w wyniku symulacji modelem CABS. Konformacje dominujące w trakcie symulacji oznaczono jako (a) oraz (b), przykład mniej dominującej konformacji oznaczono jako (c). Okręgiem zaznaczono domenę przy końcu N, której orientacja stanowi główną różnicę pomiędzy rozpatrywanymi strukturami FecA.

Model CABS okazał się również wydajnym narzędziem w przypadku modelowania pętli zewnątrzkomórkowych receptorów GPCR [47]. W celu sprawdzenia skuteczności metody, algorytm CABS zastosowano do odtworzenia konformacji drugiej pętli zewnątrzkomórkowej receptorów  $\beta$ 1- i  $\beta$ 2-adrenergicznych oraz receptora  $A_{2a}$  adenozynowego. W tym celu ze znanych już struktur eksperymentalnych usunięto odpowiednie fragmenty łańcucha peptydowego oraz podjęto próbę przewidzenia ich struktury metodą *ab initio* (wyłącznie na podstawie sekwencji aminokwasowych). Podczas symulacji na receptor zostały nałożone więzy z pominięciem modelowanego fragmentu, który pozostał w pełni ruchomy. Po odbudowie łańcuchów bocznych modelowanego fragmentu (przejściu do reprezentacji pełno-atomowej) zoptymalizowano geometrię całego receptora metodą pełno-atomowej mechaniki molekularnej. Otrzymane pętle wykazywały wysokie podobieństwo do struktur krystalicznych (wartość standardowego odchylenia położenia atomów RMSD nie przekraczała 3 Å dla fragmentów modelowanego łańcucha o długość od 24 do 31

aminokwasów). Strukturę przestrzenną otrzymanej pętli dla receptora  $\beta$ 1-adrenergicznego przedstawiono na Rysunku 3.



**Rys. 3.** Rysunek przedstawia najlepszy model drugiej zewnątrzkomórkowej pętli w receptorze  $\beta$ 1-adrenergicznym. Strukturę krystaliczną oznaczono wypełnieniem w kratkę, przewidziany model kolorem białym, a helisy transbłonowe receptora kolorem czarnym. Najlepsza uzyskana konformacja pętli wykazała duże podobieństwo do struktury eksperymentalnej (RMSD = 2.0 Å, długość pętli: 24 reszty).

## 6. Perspektywy

Obecnie przewiduje się, że zrozumienie mechanizmów funkcjonowania najważniejszych biomolekuł w komórce, w tym i układów białko-błona, będzie możliwe między innymi dzięki konstrukcji uproszczonych modeli ich funkcjonowania, które będą potrafiły uchwycić generalne zasady rządzące dynamiką ich struktury [48]. Rolą uproszczonych modeli będzie określenie kluczowych stanów układu, które będą punktem startowym dla bardziej precyzyjnych metod symulacji.

Przykładowo, proces dimeryzacji receptorów GPCR może zostać podzielony na dwa podstawowe etapy: dyfuzję dwóch receptorów w błonie oraz tworzenie dimeru przez bezpośredni kontakt dwóch białek. Symulacja pierwszego etapu może zostać wykonana z zastosowaniem reprezentacji zredukowanej (co pozwoli na ograniczenie wykorzystywanych w tym etapie zasobów obliczeniowych), podczas gdy drugi etap w reprezentacji pełnoatomowej (co pozwoli na szczegółowe zbadanie kluczowych oddziaływań białko-białko niezbędnych dla utworzenia stabilnego dimeru). Podstawowymi problemami do rozwiązania w tym przypadku są: odpowiedni dobór momentu automatycznego "przełączenia" pomiędzy różnymi rozdzielczościami oraz poprawne odwzorowanie białka w pełnoatomowej rozdzielczości bazując na jego strukturze w reprezentacji zredukowanej.

Inną, obiecującą strategią modelowania wieloskalowego jest zastosowanie modeli mieszanych. Kluczowe rejony badanych układów (miejsca wiążące ligandy, miejsca kontaktu białko-białko, czy białko-błona) mogą zostać odwzorowane w wysokiej rozdzielczości, podczas gdy ich otoczenie - mniej istotne dla rezultatów symulacji - może zostać przedstawione w reprezentacji zredukowanej.

Oprócz potrzeby rozwoju nowych, wydajnych strategii modelowania, wskazuje się również na konieczność poprawy dokładności pól siłowych, zarówno pełno-atomowych jak i zredukowanych [49, 50]. Niedawne odkrycia doprowadziły do poprawy parametrów formułowanych dla części transbłonowej białka lub lipidów zawartych w błonie, które aktualnie dotyczą większej liczby lipidów oraz lepiej odzwierciedlają pomiary eksperymentalne niż jeszcze niedawno [51-54]. Poprawne uwzględnienie wpływu interakcji białkowo-lipidowych jest ważnym elementem symulacji, ponieważ liczne badania wykazały, że cząsteczki lipidów biorą czynny udział w modulowaniu struktury białka i jego funkcji [55]. Przewiduje się, że lepsze odwzorowanie środowiska lipidów w modelach błon biologicznych oraz nowe struktury białek błonowych pozwolą w niedalekiej przyszłości na modelowanie organizacji klastrów białek błonowych i wyjaśnienie ich roli [56], np. w ścieżkach sygnałowych komórek [57].

## **Podziękowania**

Praca powstała przy wsparciu finansowym Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (numer grantu IP2011024371), Narodowego Centrum Nauki na podstawie decyzji numer DEC-2011/01/D/NZ2/05314, oraz ze środków projektu TEAM/2011-7/6 realizowanego w ramach programu Team Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

## Literatura

- [1] Arinaminpathy Y, Khurana E, Engelman DM, Gerstein MB. (2009) Computational analysis of membrane proteins: the largest class of drug targets. *Drug Discov Today*. 14, 1130-5.
- [2] Lappano R, Maggiolini M. (2012) GPCRs and cancer. *Acta Pharmacol Sin*. 33, 351-62.
- [3] Schoneberg T, Schulz A, Biebermann H, Hermsdorf T, Rompler H, Sangkuhl K. (2004) Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther*. 104, 173-206.
- [4] Carpenter EP, Beis K, Cameron AD, Iwata S. (2008) Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol*. 18, 581-6.
- [5] Salom D, Palczewski K. (2011) Structural Biology of Membrane Proteins, w: *Production of Membrane Proteins*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 249-273.
- [6] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. 305, 567-80.
- [7] Fanelli F, De Benedetti PG. (2005) Computational modeling approaches to structure-function analysis of G protein-coupled receptors. *Chem Rev*. 105, 3297-351.
- [8] Katritch V, Rueda M, Lam PC, Yeager M, Abagyan R. (2010) GPCR 3D homology models for ligand screening: lessons learned from blind predictions of adenosine A2a receptor complex. *Proteins*. 78, 197-211.
- [9] Michino M, Abola E, Brooks CL, 3rd, Dixon JS, Moulton J, Stevens RC. (2009) Community-wide assessment of GPCR structure modelling and ligand docking: GPCR Dock 2008. *Nat Rev Drug Discov*. 8, 455-63.
- [10] Avlani VA, Gregory KJ, Morton CJ, Parker MW, Sexton PM, Christopoulos A. (2007) Critical role for the second extracellular loop in the binding of both orthosteric and allosteric G protein-coupled receptor ligands. *J Biol Chem*. 282, 25677-86.
- [11] Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*. 318, 1258-65.
- [12] Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, Ijzerman AP, Stevens RC. (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*. 322, 1211-7.
- [13] Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AG, Tate CG, Schertler GF. (2008) Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*. 454, 486-91.
- [14] Chien EY, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, Hanson MA, Shi L, Newman AH, Javitch JA, Cherezov V, Stevens RC. (2010) Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science*. 330, 1091-5.
- [15] Wu B, E.Y.T. Chien, C.D. Mol, G. Fenalti, W. Liu, V. Katritch, R. Abagyan, A. Brooun, P. Wells, F.C. Bi, D.J. Harnel, P. Kuhn, T.M. Handel, V. Cherezov, R.C. Stevens (2010) Structures of the cxcr4 chemokine gpcr with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*. 330, 1066-1071.
- [16] Grossfield A. (2011) Recent progress in the study of G protein-coupled receptors with molecular dynamics computer simulations. *Biochim Biophys Acta*. 1808, 1868-78.
- [17] Dror RO, Pan AC, Arlow DH, Borhani DW, Maragakis P, Shan Y, Xu H, Shaw DE. (2011) Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108, 13118-23.

- [18] Kolinski A. (2004) Protein modeling and structure prediction with a reduced representation. *Acta Biochimica Polonica*. 51, 349-371.
- [19] Periole X, Knepp AM, Sakmar TP, Marrink SJ, Huber T. (2012) Structural determinants of the supramolecular organization of G protein-coupled receptors in bilayers. *J Am Chem Soc*. 134, 10959-65.
- [20] Raval A, Piana S, Eastwood MP, Dror RO, Shaw DE. (2012) Refinement of protein structure homology models via long, all-atom molecular dynamics simulations. *Proteins*. 80, 2071-9.
- [21] Sengupta D, Marrink SJ. (2010) Lipid-mediated interactions tune the association of glycophorin A helix and its disruptive mutants in membranes. *Phys Chem Chem Phys*. 12, 12987-96.
- [22] Bond PJ, Holyoake J, Ivetac A, Khalid S, Sansom MS. (2007) Coarse-grained molecular dynamics simulations of membrane proteins and peptides. *J Struct Biol*. 157, 593-605.
- [23] Monticelli L, Kandasamy, S.K., Periole, X., Larson, R.G., Tieleman, D.P., Marrink, S.J. (2008) The MARTINI coarse grained force field: extension to proteins. *J. Chem. Theory Comput*. 4, 819-834.
- [24] Psachoulia E, Fowler PW, Bond PJ, Sansom MS. (2008) Helix-helix interactions in membrane proteins: coarse-grained simulations of glycophorin A helix dimerization. *Biochemistry*. 47, 10503-12.
- [25] Janosi L, Prakash A, Doxastakis M. (2010) Lipid-modulated sequence-specific association of glycophorin A in membranes. *Biophys J*. 99, 284-92.
- [26] Prakash A, Janosi L, Doxastakis M. (2010) Self-association of models of transmembrane domains of ErbB receptors in a lipid bilayer. *Biophys J*. 99, 3657-65.
- [27] Roux B. (2005) Ion conduction and selectivity in K(+) channels. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 34, 153-71.
- [28] Hub JS, de Groot BL. (2008) Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 1198-203.
- [29] Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, de Vries AH. (2007) The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J Phys Chem B*. 111, 7812-24.
- [30] Kmiecik S, Jamroz M, Kolinski A. (2011) Multiscale approach to protein folding dynamics, w: *Multiscale Approaches to Protein Modeling*, Springer, New York, 281-294.
- [31] Gront D, Kmiecik S, Kolinski A. (2007) Backbone building from quadrilaterals: A fast and accurate algorithm for protein backbone reconstruction from alpha carbon coordinates. *J Comput Chem*. 28, 1593-7.
- [32] Kmiecik S, Gront D, Kolinski A. (2007) Towards the high-resolution protein structure prediction. Fast refinement of reduced models with all-atom force field. *BMC Struct Biol*. 7, 43.
- [33] Flores SC, Bernauer J, Shin S, Zhou R, Huang X. (2012) Multiscale modeling of macromolecular biosystems. *Brief Bioinform*. 13, 395-405.
- [34] Kalli AC, Hall BA, Campbell ID, Sansom MS. (2011) A helix heterodimer in a lipid bilayer: prediction of the structure of an integrin transmembrane domain via multiscale simulations. *Structure*. 19, 1477-84.
- [35] Hall BA, Chetwynd AP, Sansom MS. (2011) Exploring peptide-membrane interactions with coarse-grained MD simulations. *Biophys J*. 100, 1940-8.
- [36] Stansfeld PJ, Hopkinson, R.J., Ashcroft, F.M., and Sansom, M.S.P. (2009) The PIP<sub>2</sub> binding site in Kir channels: definition by multi-scale biomolecular simulations. *Biochemistry*. 48, 10926-10933.

- [37] Hansen SB, Tao X, MacKinnon R. (2011) Structural basis of PIP2 activation of the classical inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.2. *Nature*. 477, 495-8.
- [38] Kolinski A, Bujnicki JM. (2005) Generalized protein structure prediction based on combination of fold-recognition with de novo folding and evaluation of models. *Proteins*. 61, 84-90.
- [39] Kurcinski M, Kolinski A. (2007) Hierarchical modeling of protein interactions. *J Mol Model*.
- [40] Kmiecik S, Kolinski A. (2007) Characterization of protein-folding pathways by reduced-space modeling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104, 12330-5.
- [41] Kmiecik S, Kolinski A. (2008) Folding pathway of the b1 domain of protein G explored by multiscale modeling. *Biophys J*. 94, 726-36.
- [42] Kmiecik S, Kolinski A. (2011) Simulation of chaperonin effect on protein folding: a shift from nucleation-condensation to framework mechanism. *J Am Chem Soc*. 133, 10283-9.
- [43] Kmiecik S, Kurcinski M, Rutkowska A, Gront D, Kolinski A. (2006) Denatured proteins and early folding intermediates simulated in a reduced conformational space. *Acta Biochim Pol*. 53, 131-44.
- [44] Kmiecik S, Gront D, Kouza M, Kolinski A. (2012) From Coarse-Grained to Atomic-Level Characterization of Protein Dynamics: Transition State for the Folding of B Domain of Protein A. *J Phys Chem B*.
- [45] Sen TZ, Kloster M, Jernigan RL, Kolinski A, Bujnicki JM, Kloczkowski A. (2008) Predicting the complex structure and functional motions of the outer membrane transporter and signal transducer FecA. *Biophys J*. 94, 2482-91.
- [46] Gront D, Kolinski A. (2005) HCPM--program for hierarchical clustering of protein models. *Bioinformatics*. 21, 3179-80.
- [47] Kolinski M, Filipek S. (2010) Study of a structurally similar kappa opioid receptor agonist and antagonist pair by molecular dynamics simulations. *J Mol Model*. 16, 1567-76.
- [48] Russel D, Lasker K, Phillips J, Schneidman-Duhovny D, Velazquez-Muriel JA, Sali A. (2009) The structural dynamics of macromolecular processes. *Curr Opin Cell Biol*. 21, 97-108.
- [49] Mackerell AD, Jr. (2004) Empirical force fields for biological macromolecules: overview and issues. *J Comput Chem*. 25, 1584-604.
- [50] Scheraga HA, Khalili M, Liwo A. (2007) Protein-folding dynamics: overview of molecular simulation techniques. *Annu Rev Phys Chem*. 58, 57-83.
- [51] Klauda JB, Venable RM, Freites JA, O'Connor JW, Tobias DJ, Mondragon-Ramirez C, Vorobyov I, MacKerell AD, Jr., Pastor RW. (2010) Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *J Phys Chem B*. 114, 7830-43.
- [52] Kukol A. (2009) Lipid models for united-atom molecular dynamics simulations of proteins. *J. Chem. Theory Comput*. 5, 615-626.
- [53] Poger D, and A.E. Mark. (2009) On the validation of molecular dynamics simulations of saturated and cis-monounsaturated phosphatidylcholine lipid bilayers: a comparison with experiment. *J. Chem. Theory Comput*. 6, 325-336.
- [54] Ulmschneider JP, and Ulmschneider, M.B. (2009) United atom lipid parameters for combination with the optimized potentials for liquid simulations all-atom force field. *J. Chem. Theory Comput*. 5, 1803-1813.
- [55] Lee AG. (2009) Structural biology: Highly charged meetings. *Nature*. 462, 420-1.
- [56] Stansfeld PJ, Sansom MS. (2011) Molecular simulation approaches to membrane proteins. *Structure*. 19, 1562-72.

- [57] Salaita K, Nair PM, Petit RS, Neve RM, Das D, Gray JW, Groves JT. (2010) Restriction of receptor movement alters cellular response: physical force sensing by EphA2. *Science*. 327, 1380-5.