www.scichina.com

life.scichina.com



# BtuC-POPC 脂膜体系的分子动力学模拟

孙庭广, 刘明, 陈慰祖, 王存新\*

北京工业大学, 生命科学与生物工程学院, 北京 100124

\* 联系人, E-mail: cxwang@bjut.edu.cn

收稿日期: 2009-04-07; 接受日期: 2009-04-23

国家自然科学基金(批准号: 20773006 和 30670497)、北京市自然科学基金(批准号: 7082006 和 5072002)和高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 200800050003)资助项目

摘要 大肠杆菌的维生素 B<sub>12</sub>转运蛋白(BtuCD)属于 ATP 结合盒转运蛋白,目前对 BtuCD 转运底物进入胞质内的确切机制仍不清楚. 本研究将 BtuCD 的跨膜结构域 BtuC 插入棕榈酰油酸磷脂酰胆碱(POPC)双层膜中,通过 MD 模拟来研究 BtuC 的功能性运动. 通过超过 57 ns 的 MD 模拟得到了稳定的蛋白质-脂双层膜体系. 模拟结果发现, POPC 双层膜能够调整其厚度以适应其中的 BtuC. 反映脂双层膜性质的两个参数,即每个脂分子的面积和脂双层膜厚度,均与实验测得数据吻合. 通过对从 MD 模拟提取的轨迹进行主成分分析(PCA),使得能从原子水平上了解 BtuC 的几种主要运动模式. 结果表明,尽管 BtuC 的几种主要运动模式各不相同,却都实现了跨膜通道维度的改变,控制通道开口的打开和闭合. 这些 BtuC 运动模式和与其相互作用的BtuF 和 BtuD 的功能性运动很好的偶合. BtuC 的运动主要体现在周质一侧的区域,控制跨膜通道在该侧开口的大小. MD 模拟过程中,这一侧开口可以比晶体结构反映的"开放"状态更开放.在胞质一侧,并未观察到通道开口的明显变化. 意外的是,尽管 BtuC 两个结构域具有相同的序列和类似的高级结构,但它们在运动上却有明显差异. 这些结果有助于在原子水平上理解底物的转运机制.

关键词 BtuCD POPC 脂膜 功能性运动 主成分分析

ATP 结合盒(ATP binding cassette, ABC)转运系统是生物体内普遍存在的跨膜转运系统,其借助 ATP 化学能进行底物的跨膜转运<sup>[1]</sup>. 该系统转运的底物包括离子、多肽、糖类和脂类等<sup>[2~5]</sup>. 许多 ABC 转运系统与医学相关,例如涉及肿瘤的多抗药性(即某些肿瘤细胞将化疗过程中使用的细胞毒性剂排出的能力)、细胞免疫应答、感染性病原体的耐药性等<sup>[6~8]</sup>.

细菌的周质空间中有一类 ABC 转运系统, 称为周质转运系统. 该系统由周质结合蛋白和跨膜转运蛋白组成, 周质空间中的物质被周质结合蛋白捕获并经由跨膜转运蛋白中的跨膜通道转运进胞质中.

跨膜转运蛋白包括跨膜亚基和胞质内的 ATP 结合亚基, 两者各由两个相同的结构域组成. 跨膜亚基由多个跨膜α-螺旋组成, 这些螺旋构成跨膜通道. 来自不同物种的跨膜亚基同源性较低, 而 ATP 结合亚基却是高度保守的. ATP 结合亚基上具有 ATP 的结合位点, ATP 水解释放的能量能使它的两个结构域发生构象改变, 这种构象的改变可以传递给与其非共价结合的跨膜亚基, 从而促使后者发生构象改变而实现底物的跨膜转运<sup>[9,10]</sup>.

尽管已经获得了多种 ATP 结合亚基的晶体结构, 但由于跨膜亚基是膜结合蛋白而难以获得晶体,因 此目前仅获得了来自 3 种物种的完整 ABC 转运蛋白的高分辨率晶体结构,其中包括 BtuCD[11~13]. BtuCD 是革兰氏阴性细菌中维生素  $B_{12}$  转运系统的跨膜转运蛋白,负责将周质结合蛋白 BtuF 捕获的维生素  $B_{12}$  转运进胞质内[14]. 其跨膜亚基 BtuC 包括 648 个残基,ATP 结合亚基 BtuD 则包含 462 个残基. BtuC 的两个结构域各有 10 个跨膜 $\alpha$ -螺旋,结构域之间形成维生素  $B_{12}$  的跨膜通道. 在胞质一侧,两个短 $\alpha$ -螺旋与BtuD 接触,该结合区构成了 BtuC 和 BtuD 之间能量传递的区域.

通过生化实验和解析转运蛋白的结构表明, 在 底物转运过程中跨膜转运蛋白经历大的构象改变[15], 并提出了BtuCD转运维生素B<sub>12</sub>的机制[13]. 但实验观 察到的只是一些较稳定的状态, 若要了解 BtuCD 转 运底物的整个动态过程还需借助其他方法. 其中一 种已经用来研究膜蛋白构象变化的方法是基于分子 三维结构的分子动力学(MD)模拟方法[16,17]. 最近, 有人用 MD 模拟方法研究了 BtuCD<sup>[18~20]</sup>. Oloo 和 Tieleman<sup>[18]</sup>构建了 BtuCD-POPE 脂膜体系并对该体 系进行了 15 ns 的 MD 模拟, 以研究 MgATP 与 BtuD 结合时对 BtuCD 构象变化的诱导. 他们认为 MgATP 的结合能引起 BtuD 两个结构域的相互靠拢并诱导 BtuC 的构象改变. 但该研究只说明了 BtuC 中的跨膜 通道的开口在 BtuD 两个结构域靠拢时能发生改变, 却没有描述 BtuC 实现该过程时结构重排的细节. 事 实上, 无法确定模拟过程中 BtuC 的构象变化是由 BtuD 引起的还是由其自身性质决定的. Ivetac 等人[20] 对该体系作了更细致的 MD 模拟, 模拟的体系包括 BtuD, BtuD-ATP, BtuCD 和 BtuCD-ATP, 为了考虑 BtuF 的影响, 他们的模拟体系甚至还包括了 BtuCDF 和 BtuCDF-ATP. 其结果表明, ATP 确实能引起 BtuD 两个结构域的闭合; 但在 BtuCD 体系中却无法实现 该闭合,除非有BtuF的结合来诱导.通过对MD轨迹 进行主成分分析, 他们还描述了以上各体系的运动 模式. 该模拟研究细致地描述了 BtuD 在 ATP 结合的 诱导下发生的闭合运动以及 BtuC, BtuD 和 BtuF 之间 运动的协调, 并首先提出了两个 ATP 交替水解的机 制. 但由于体系大而模拟时间相对较短(不超过 15 ns), 因此主成分分析不能很好地体现 BtuC 的功能性 运动模式. 主成分分析结果的准确性取决于MD模拟 采样的充分性,模拟时间越长采样越充分. 对于像 BtuCD-脂膜这么复杂的体系,所需的 MD 模拟时间 就应该更长. 但复杂体系对计算机资源的耗费与所 需模拟时间更长形成了矛盾,这也是前面这些研究 模拟时间短的原因. 这样,较短的模拟时间和脂膜的 束缚使得难以观察到 BtuC 大的构象变化,目前还未见清楚描述 BtuC 功能性运动模式的报道. 由于跨膜通道完全是由 BtuC 构成,要理解跨膜通道的变化并进一步理解其转运机制,需要更清楚地了解 BtuC 内在的构象变化性质.

蛋白质的功能性运动模式是由蛋白质自身的内在性质决定的,其高级结构决定了其运动的自由度,这也是应用简单的弹性网络模型(例如高斯网络模型和各向异性网络模型)就能粗略预测蛋白质功能性运动模式的基础<sup>[21,22]</sup>. 因此,通过对 BtuC-脂膜体系进行较长时间的 MD 模拟来分析 BtuC 内在的主要运动模式,并与 BtuF 和 BtuD 的运动模式比较,应该能促进对 BtuCD 跨膜转运机制的理解.

本研究构建了 BtuC 镶嵌于棕榈酰油酸磷脂酰胆碱(POPC)脂膜中的体系,并进行了超过 57 ns 的 MD模拟,以从原子水平上理解 BtuC 的功能性运动.

## 1 体系和方法

#### 1.1 模拟体系

模拟体系由 POPC 脂膜和镶嵌于其中的 BtuC 组成(图 1). 脂膜是由上下两层各 119 个 POPC 脂分子组成,每个 POPC 分子具有相同的初始结构. BtuC 的结构来自 BtuCD 的晶体结构(PDB 号为 1L7V<sup>[13]</sup>). 根据实验信息将 BtuC 插入 POPC 脂膜内,通过带电残基带确定 BtuC 相对磷脂双层膜的正确位置. 在脂膜-蛋白质体系中加入 15483 个 TIP3P 水分子<sup>[23]</sup>,并加入 17个 CI<sup>-</sup>以平衡体系电荷. 整个模拟体系的大小为12.4×10.1×8.6 nm³,包括 88447 个原子.模拟体系用VMD 软件<sup>[24]</sup>构建.

#### 1.2 MD 模拟

MD 模拟用 NAMD 2.5 程序包<sup>[25]</sup>进行,采用 CHARMM27 力场<sup>[26]</sup>. 采用 10~12 Å 的双截断半径进

行范德华相互作用计算,并采用 PME 方法计算长程静电作用力<sup>[27]</sup>. 使用周期性边界条件. 模拟过程中温度保持在 300 K,同时保持 1 个大气压的恒压.

为使该体系达到平衡,首先固定磷脂头部和蛋白质,用最陡下降法进行 1000 步的能量优化来优化磷脂尾部和水分子,然后固定磷脂尾部和蛋白质对磷脂头部和水分子继续进行1000步能量优化.在表1中描述的第1次MD模拟后,去掉所有约束,对整个体系进行1×105步的能量优化.其他MD模拟步骤在

表 1 中列出. 得到的 MD 轨迹用 VMD 进行观察和分析, 蛋白质的功能性运动用 GROMACS 程序包<sup>[28]</sup>进行主成分分析<sup>[29]</sup>.

## 2 结果和讨论

### 2.1 脂膜的平衡

每个脂分子的面积(area per lipid, APL)是磷脂双层膜的一个最重要的性质并通常在模拟过程中用来 监控脂膜的平衡.

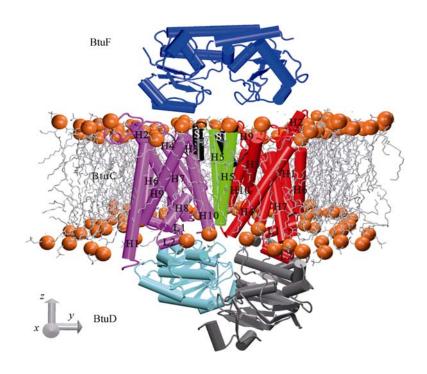


图 1 BtuC-POPC 模拟体系

该图用 VMD 软件绘制,蛋白质结构 Cartoon 绘图方法描绘. BtuF 显示为蓝色; BtuC 的两个结构域分别显示为红紫色和红色; 其中来自两个结构域的短螺旋结构(S1)显示为黑色; 两个α-螺旋 H5 用绿色显示; BtuD 的两个结构域分别显示为灰色和青色; POPC 分子头部放大的磷原子显示为橙色,疏水尾部显示为银色. BtuC 的所有螺旋标记为 H1-H10,与 BtuD 接触的两个短螺旋标记为 L1 和 L2

表 1 模拟步骤

MD步骤	温度/K	约束 <sup>*</sup>	时间/ps	目的
1	400	磷脂头部/蛋白质	250	"熔化"磷脂尾部
2	0~300	磷脂头/尾/水/蛋白质	10×50	10 次约束 MD 模拟, 每次升温 30 K
3	300	磷脂头/尾/水/蛋白质	50	约束 MD 模拟
4	300	磷脂头/尾/水/蛋白质	250	约束 MD 模拟
5	300	无	250	常规 MD 模拟
6	300	无	$5.75 \times 10^4$	常规 MD 模拟

<sup>\*</sup> 约束应用在重原子上,在步骤 1 中,脂分子头部、蛋白质和水分子固定;在步骤 2~4 中,脂分子头部、脂分子尾部、水分子、蛋白质分别用系数为 10,5,2,8 kcal·mol<sup>-1</sup>· Å<sup>-2</sup>,5,2,0,4 kcal·mol<sup>-1</sup>· Å<sup>-2</sup> 和 2,0,0,1 kcal·mol<sup>-1</sup>· Å<sup>-2</sup> 的约束势约束

由于本实验所用磷脂双层膜由 238 个相同的疏水尾部为直形的 POPC 分子构建,该双分子脂膜需要一伴随与 BtuC 相互作用而达到平衡的过程. 由图 2 可见,在模拟过程中,POPC 脂膜的 APL 不断降低. APL 经过降低约 10 Ų,在大约 40 ns 后达到平衡,此后在超过 17 ns 的时间内保持为(63.0±0.7) Ų. 该值略低于先前 MD 模拟纯 POPC 脂膜所得到平均值(64±1) Ų[30]和 66.5 Ų[31],但仍然接近 X-射线衍射实验的结果, X-射线衍射实验得到的 APL 为 63~66 Ų[32.33].

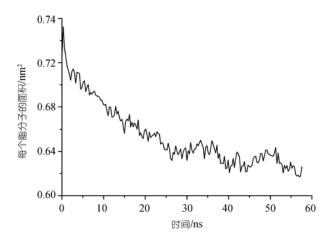


图 2 脂膜的每个脂分子的面积随 MD 模拟时间的变化

磷脂双层膜的另一重要性质是厚度,不同的脂膜具有不同的厚度.本实验使用下面的公式<sup>[34]</sup>来计算 POPC 双层膜的有效厚度:

$$d = \int \frac{\rho_{\text{lipid}}}{\rho_{\text{lipid}} + \rho_{\text{water}}} dz.$$

其中 $\rho_{lipid}$  与 $\rho_{water}$  分别是磷脂和水的密度. 模拟结果显示, POPC 脂膜的厚度也在约 40 ns 后达到平衡, 这与 APL 的平衡同步. 在 40 ns 后其厚度为(43.5±0.3) Å(图 3). 该值大于 X-射线衍射实验所获得的纯 POPC 脂膜的厚度(35~41) Å<sup>[35]</sup>. 值得注意的是, 该厚度值更接近于棕榈酰油酸磷脂酰乙醇胺(POPE)的厚度,实验所测得的 POPE 脂膜的厚度为 43.9 Å<sup>[36]</sup>. 由于BtuCD 是大肠杆菌的跨膜蛋白,而 POPE 分子是大肠杆菌脂膜的主要成分,所以在 MD 模拟中, POPC 脂膜具有类似 POPE 的厚度来匹配 BtuC 是合理的. 这

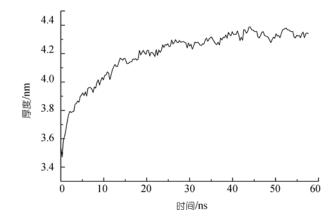


图 3 脂膜的每个脂分子的厚度随模拟时间的变化

种厚度增加可以通过 POPC 分子減小疏水尾部的弯曲度来实现,而这种尾部弯曲度的减小必然导致 POPC 分子之间的距离减小,这与本实验观察到的略小的 APL 值相吻合.

有人<sup>[20]</sup>曾用二棕榈酰磷脂酰胆碱(DMPC)来模拟 BtuCDF 体系,但没有报道该脂膜的厚度.本实验 MD 模拟表明, POPC 脂膜能够调整其厚度以匹配嵌 于其中的蛋白质而形成稳定的膜-蛋白质体系.

为了确定驱动脂膜调整其厚度来匹配跨膜蛋白的作用力,本实验研究了POPC脂膜与BtuC之间的相互作用(数据未显示).正如预期,脂膜与蛋白质之间的长程相互作用力起了关键作用.在MD模拟过程中,静电相互作用能不断降低,同时能量负值增大,在40 ns 后达到稳定.这说明POPC的极性头部与BtuC 非跨膜部分的带电区相互吸引,脂膜上层与BtuC 在周质一侧的带电区靠近,脂膜下层与BtuC 在胞质一侧的带电区靠近,从而促使脂膜增厚而达到与BtuC 的结构匹配.

POPC 脂膜极性头部与 BtuC 脂膜外带电区的接近也可以从它们两者间的氢键形成得到印证. 在模拟开始的第1 ns 中, 两者间形成的氢键中占有率大于30%的只有10 对, 而占有率大于60%的仅有1 对. 在MD 模拟的最后1 ns 统计的氢键中, 占有率大于30%的有38 对, 而占有率大于60%的氢键对有8 对. 这反映了 POPC 脂膜的极性头部与 BtuC 的带电部分在模拟过程中相互靠近, 使得形成的氢键对的数目和稳定性增加.

## 2.2 BtuC 体系的平衡

由于 BtuC 分子数相对于脂膜来说较少且受脂膜的约束,因此在模拟过程中比 POPC 脂膜更容易达到平衡. MD 轨迹分析显示,在模拟进行到最后的松弛步骤(表 1 中的 MD 步骤 5)后 BtuC 达到平衡,主链原子的均方根偏差(RMSD)稳定在 2.2 Å 左右. 因此本实验用于分析的 MD 模拟轨迹均来自表 1 中的 MD步骤 6.

计算了 BtuC 内跨膜通道中心的矢量和脂膜平面 法线间的夹角,以反映 BtuC 与脂膜的相对位置. 跨膜通道中心的矢量被定义为 BtuC 两个结构域的残基 Thr142 的几何中心指向来自两个结构域的残基 Ser167 的几何中心. 由于在构建模拟体系时将脂膜平面设定为坐标系的 x-y 平面,因此其法线为坐标系 z 轴. 在初始构建的 BtuC-POPC 体系中,该夹角为  $9.5^\circ$ ,在 57.5 ns 的模拟过程中,该夹角的平均值为  $(9.2\pm0.9)^\circ$ . 这说明在构建的模拟体系中,BtuC 和 POPC 脂膜的相对位置仅进行了小的调整并保持相对稳定.

#### 2.3 BtuC 的柔性分析

图 4 显示了 MD 模拟过程中 BtuC 每个  $C_{\alpha}$ 原子 的均方根涨落(RMSF). 可以看出, 具有相同序列和

几乎一致三维结构的两个结构域在大多数区域,尤其是跨膜α-螺旋表现出相似的柔性特点,但在一些区域也存在明显的差别.

正如预期, 在跨膜螺旋间的 loop 区(图 4 中标出 的残基范围)具有更大的柔性. 具体来说, 残基 Metl 和残基 Ala324 周围的区域分别处于 N-端和 C-端, 较 少受其他部分的束缚, 所以显示出最大的柔性. 在胞 质一侧, α-螺旋 H2 和 H3 之间的 loop 区(Phe81-Leu90) 的柔性在两个结构域之间有较明显的差异, 左边明 显高于右边(左右结构域由图 1 所示位置标明). 与 BtuD 亚基接触的短螺旋 L1 或 L2, 即位于 H6 和 H7 之间的残基 Ser208~Leu226, 右边结构域上的柔性比 左边结构域上的柔性大. 胞质一侧位于螺旋 H8 和 H9 之间的 loop 区 Leu266~His272 也具有同样的柔性特 点. 可见, 尽管两个结构域的结构对称, 但它们的运 动却是不对称的. 在下面的主成分分析中将看到, Ser208~Leu226 和 Leu266~His272 这两个区域是属于 具有类似运动的一个模块, 而 loop 区 Phe81~Leu90 是属于另一具有类似运动的模块.

另一个柔性较大的区域是螺旋 H5 在周质一侧的末端,及其与螺旋 H6 之间的 loop 区(Ala163~Val186). 螺旋 H5 控制着跨膜通道,因此 H5 具有较大柔性是与其功能相符合的. 这段 loop 区还包括一段短的螺

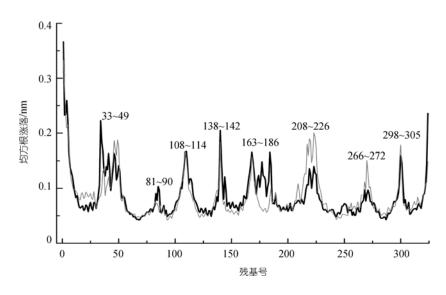


图 4 BtuC 体系 C。原子的均方根涨落

均方根涨落较大的 loop 区用残基号范围标出. 黑色和灰色曲线分别代表图 1 中 BtuC 左边和右边结构域对应的均方根涨落

旋结构(即, Thr168~Gly184), 简称为 S1. Hvorup 等人[37]认为, 在 BtuF "对接"至 BtuC 上时 S1 可以插入 BtuF 的底物结合口袋, 促使底物转移进 BtuC 中的通道. 在本实验 MD 模拟中, S1 表现出较大的柔性, 可能是行使该功能所必需的. 此外, S1 的柔性在两个结构域上也不一致, 左边的结构域可能起主要作用.

### 2.4 主成分分析

尽管进行了超过 57 ns 的 MD 模拟, 但这个时间尺度还不足以观察到完成转运过程的整个功能性运动(约≥100 ms<sup>[38]</sup>). 研究表明, 蛋白分子的自由度虽然非常多, 但是其大部分的运动都集中在非常少量的自由度上, 这些自由度构成一个"基本子空间", 在这个子空间内的运动与蛋白质的功能密切相关. 主成分分析(PCA)可以用于分离该子空间, 能更清楚理解蛋白质的功能性运动模式. PCA 已经成功地用来分析蛋白质的功能性运动机制<sup>[39,40]</sup>. 对 BtuC 主链原子进行 PCA 分析显示, 这些运动中超过 54%的运动对应于最大的前 5 个本征值, 而其他 46%的运动对应着剩余的 2557 个本征值. 图 5 显示了前 5 个本征矢量对应的运动模式. 这里需要说明的是, 图中显示的运动方向只是从一个极端构象到另一个极端构象的方向, 事实上, 运动方向可以是所指示方向的反方向.

结果表明, BtuC 的第一主成分占总运动的 30%. 该运动模式大体可以描述为: 在胞质一侧, 两个结构域相互背离(图 5(A)中箭头所示), 而在周质一侧则相互靠近. 这与 Davidson 和 Chen<sup>[15]</sup>所观察到的麦芽糖转运蛋白 MalFGK2 的转运模式类似. Ivetac 等人<sup>[20]</sup>的 MD 模拟研究也认为 BtuC 有类似运动, 但他们把该运动模式简单地理解为两个结构域各自作为一个刚性整体的相对运动. 本实验模拟中, 这种运动看起来要复杂得多: 结构域中的α-螺旋可以归属于具有不同运动模式的模块.

从胞质一侧观察,可以将α-螺旋 H1, H2, H6, H7, H8 和 H9 以及短螺旋 L1 和 L2 归属为一个模块,来自两个结构域的该模块相互背离运动,而其余部分则属于另一个模块,来自两个结构域的该模块相互靠近运动.

从周质一侧观察(图 5(B), α-螺旋 H1, H2, H6, H7

和 H9 属于一个模块,来自两个结构域的该模块有相互靠近的运动. 值得注意的是,该模块包括与 BtuF 的两个球状结构域接触的区域(图 5(B)中椭圆所示区域,包含关键的接触残基 Arg56),因此在 BtuC 与BtuF 结合时,该模块的运动可能会影响 BtuF 两个球状结构域的运动,使这两个球状结构域发生位置变化,促进两个球状结构域中间夹着的底物的释放. α-螺旋H3,H4,H5组成了另一模块,来自两个结构域的该模块具有背离通道中心的运动,最明显的是两个关键螺旋 H5 的相互背离,改变了由螺旋 H5 控制的通道在 x-z 平面上的维度.

螺旋 H5 位于跨膜通道的两侧,与螺旋 H10 以及 螺旋 H3 和 H8 的一部分构成了一个容纳底物的通道. H5 在胞质一侧末端的残基(Thr142)构成了通道在该 侧最窄的"门"区域[13]. 本实验将螺旋 H5 在胞质一侧 的末端残基 Thr142 指向其在周质一侧的末端残基 Ser167 的矢量作为螺旋 H5 的矢量,则左右两个结构 域的这两个矢量的夹角变化可以反映通道的维度在 x-z 平面上的变化. 此外, 将 4 个点(左边结构域上的 Thr142 的质心(142L)和 Ser167 的质心(167L)以及右边 结构域对应的点 142<sub>R</sub> 和 167<sub>R</sub>)限定的两个平面(即平 面 142<sub>R</sub>-142<sub>L</sub>-167<sub>L</sub>和平面 142<sub>L</sub>-142<sub>R</sub>-167<sub>R</sub>)之间的夹角 定义为两个螺旋 H5 之间的二面角, 则该二面角变化 可以反映通道的维度在 y-z 平面上的变化. 同时, 将 来自两个结构域的一对残基 Thr142 间的距离以及一 对残基 Ser167 间的距离用来大致反映 BtuC 跨膜通道 在胞质一侧和周质一侧开口的大小. 为了监控这些 变量,将MD模拟的轨迹投影在各本征矢量上并计算 这些角度和距离的变化(图 6).

结果显示,第一运动模式导致螺旋 H5 之间的二面角在 26.66°~36.26°之间变化,夹角在 32.23°~46.8°之间变化.这表明,在该运动模式下 BtuC 中的跨膜通道在两个不同方向上的维度能发生显著地改变.晶体结构中 H5 螺旋之间的二面角和夹角分别是35.28°和 41.08°,均分别处于上面的两个范围内.这暗示 BtuC 能达到的"开放"程度要大于晶体结构的"开放"程度,即晶体结构状态仅是一个中间状态.从测得的二面角和夹角范围的下限来看,二面角和夹角与晶体结构的"开放"状态比较分别减少了8.83°和

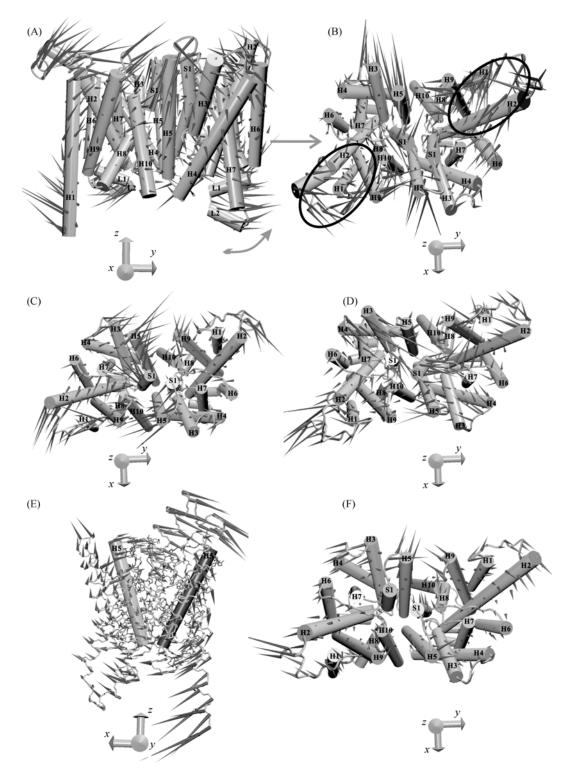


图 5 BtuC 运动主成分分析

(A)和(B) 第一主成分示意图. (B) 中椭圆所示部分是与 BtuF 接触的区域; (C)~(F) 分别为第二、第三、第四主成分示意图. 坐标系 z 轴的方向与 POPC 脂膜(没有示出)平面的法线方向相同. 圆锥的长短表示运动幅度的大小, 圆锥的方向为从一个极端结构到 另一极端结构. 所有标记与图 1 相同

8.85°, 即跨膜通道在周质一侧有明显的闭合运动.

前面的柔性分析已经表明短螺旋 S1 有较大的位置变化,观察该运动模式可清楚地看出螺旋 S1 具有向跨膜通道在周质一侧开口的中心移动的运动,而且在两个结构域中的运动幅度是有差异的.与晶体结构比较,左边结构域的 S1(图 5(A))的质心可产生至多5.7 Å的偏移,而右边结构域的质心仅产生至多1.3 Å的偏移. 左边的短螺旋 S1 就像一个"盖子",在周质一侧发生闭合运动时盖住通道在该侧的开口,当发生开放运动时, S1 又偏离通道中心,使得底物能够到达通道.可以想象,如果在 Btuf "对接"至 BtuC 上后 S1 确实能插入 BtuF 两个结构域之间的活性口袋的话,那么 S1 的这种运动势必会影响 BtuF 的结合.这印证了 S1 及周围的 loop 区结构可能对 BtuF 与 BtuC 结合起重要作用[41].

另外,第一本征矢量对应的运动主要影响跨膜通道在周质一侧的区域,而对通道在胞质一侧的开口影响甚小.两个结构域的螺旋 H5 在周质一侧末端的残基对(即 Ser167 残基对)之间的距离和胞质一侧

末端的残基对(即 Ser142 残基对)之间的距离可反映 跨膜通道在这两侧的变化. 结果表明, Ser167 残基对 之间的距离变化范围是 28.50~37.67 Å, 而 Ser142 残基对的距离仅有 0.05 Å 的变化(图 6(A)和(B)).

图 5(C)显示了对应于第二本征值的 BtuC 运动模式. 从周质一侧来看, BtuC 两个结构域的运动模式也不完全一致. 在左边的结构域中, 螺旋 H3, H4, H5 与螺旋 H1, H2, H6, H7, H8, H9, H10 各自组成了运动方向相反的两个独立部分. 在周质一侧这两个部分相互背离, 同时牵引短螺旋 S1 离开通道开口的中心. 而右边的结构域大致具有绕 z 轴顺时针扭转的运动,整体的运动幅度低于左边结构域. 这两个结构域的运动虽然不一致, 但它们均导致跨膜通道在胞质一侧开口的改变. 尽管第二运动模式仅占总运动的 11%, 但是在该运动模式下, H5 螺旋之间的二面角在29.66°~40.03°之间变化, 夹角在38.3°~46.47°之间变化, 幅度仅略小于第一运动模式. 同样, 晶体结构中H5 螺旋之间的二面角和夹角也在这个范围内, 也表明晶体结构是其中一个中间状态. 在该运动模式下,

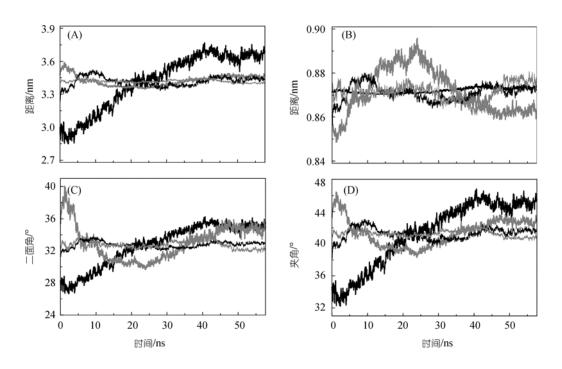


图 6 主要运动模式对跨膜通道的影响

(A) 模拟过程中 Ser167 对之间的距离变化; (B) 模拟过程中 Ser142 对之间的距离变化; (C) 两个 H5 螺旋的 4 个端点构成的两个平面之间的二面角变化; (D) 模拟过程中两个 H5 螺旋之间的夹角变化. 黑色粗线、灰色粗线、黑色细线、灰色细线分别对应第一、第二、第三、第四主成分

Ser167 残基对的距离变化是 2.43 Å,接近第一运动模式对应值的 1/4, Ser142 残基对的距离变化为 0.47 Å,尽管变化也很小,却大约是第一运动模式所引起的相应变化的 9 倍.

从图 5(D)可以看出,第三运动模式与第一运动模式相反.具体来说,是两个结构域的螺旋 H3, H4, H5, H7 相对运动,往通道中心靠近,同时短螺旋 S1 盖住通道在周质一侧的开口.而螺旋 H1, H2, H8, H9, H10 则向通道外侧偏移.从该运动模式也可以看出 BtuC 的结构域存在着轻微的扭转运动,左边的结构域表现出围绕 z 轴的顺时针运动.

从图 5(E)可以清楚地看出,第四个运动模式比前面的运动模式协同性要高,即每个结构域各自作为一个刚性整体运动.在该运动模式下,两个结构域以 y 轴为轴心发生相对运动,最直接的效果是两个螺旋 H5 像剪刀一样发生剪切运动.由于螺旋 H5 控制着 BtuC 内部的跨膜通道,这种运动模式势必能改变该通道的大小.在该运动模式下,螺旋 H5 之间的二面角和夹角分别有 2.22°和 1.91°的变化,而 Ser142 残基对之间的距离以及 Ser167 残基对之间的距离分别有 0.59 Å 和 0.20 Å 的改变.

第五个运动模式仅占总运动的 3%, 从图 5(F)来看, BtuC 结构的模式和幅度都不太明显. 该运动模式以及后面更小的运动模式不足以反映 BtuC 的功能性运动.

## 2.5 BtuC 与 BtuD 和 BtuF 运动模式的匹配

BtuC 只有在与 BtuF 和 BtuD 相结合时才能行使 其生物学功能,因此 BtuC 所具有的内在运动模式应 该与 BtuF 和 BtuD 的运动模式相匹配. 尽管本实验只 研究了 BtuC, 但另外两个组分已经得到大量研究, 它们的功能性运动已经得到很好的阐述. Kandt 等 人<sup>[42]</sup>认为,BtuF 的两个球状结构域具有向平面内外 摆动的第一运动(即一个球形结构域向平面内运动, 而另一结构域则向平面外运动)和结构域间开合的第 二运动,如图 7(A)和(B)所示.

由图 5 所示 BtuC 的主要运动模式可知, BtuF 的第二运动模式(图 7(B))与 BtuC 的第一运动模式(图 5 (A))相匹配. 在 BtuC 的第一运动模式下,与 BtuF 的两个结构域接触的区域(图 5(B)圈出的区域)明显相互靠拢,从而与 BtuF 所具有的结构域之间的开合运动相协调. BtuC 的第二运动模式虽然与第一运动模式不同,但也可以看出与 BtuF 接触的两个区域有相互背离的运动,这能促进 BtuF 的结构域之间张开. 对于 BtuF 的第一运动模式来说,与其最匹配的是 BtuC 的第三运动模式. 当 BtuC 的两个结构域之间发生图5(E)所示的剪切运动时,与 BtuF 接触的区域所产生的运动与 BtuF 结构域向平面内外摆动的运动(图 7(A))一致.

BtuD 的两个结构域呈"L"形, 对其结构域之间的运动已经研究得比较清楚[37.43.44]. 根据已获得的结

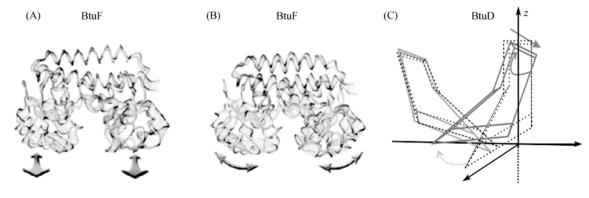


图 7 BtuF 和 BtuD 的运动模式图

(A)和(B) 分别描述了 BtuF 的第一和第二运动模式<sup>[42]</sup>, 箭头指示运动方向; (C) 描述 BtuD 两个结构域相互靠拢所发生的运动的示意图, 坐标系 z 轴为脂膜平面的法线, 虚线描绘的 "L" 形物体代表 BtuD 两个未靠拢的结构域, 实线描绘的 "L"形物体代表 BtuD 两个靠拢后的结构域, 在其中一个结构域与 BtuC 接触的部位用实线箭头指示了该部位产生的运动趋势

论,用示意图描述了 BtuD 的两个结构域相互靠拢时的情景(图 7(C)).可见,当 BtuD 的两个结构域靠拢时,与 BtuC 接触部位具有向外翘动的运动(图 7(C)实线直箭头所示).在 BtuC 的第一运动模式中,与 BtuD 接触的区域(短螺旋 L1 和 L2)具有显著的向外翘起的运动(图 5(A)箭头所示).当 BtuD 在 ATP 水解能的驱动下发生该运动时,势必会促进 BtuC 在该自由度上的运动.此外,图 7(C)还显示了 BtuD 上与 BtuC 的接触区域具有扭转运动,如实线弯曲箭头所示.这种运动也能在 BtuC 上找到相匹配的运动,无论是 BtuC 的第二运动模式还是第三运动模式,BtuC 的结构域都存在扭转运动.

由此可见, BtuC 中由其结构决定的内在自由度能满足 BtuF 和 BtuD 所具有的功能性运动. 与 BtuF 和 BtuD 相结合发挥生物学功能时, BtuC 能将整个跨膜传递过程偶合起来. 当胞质内的 BtuD 借助 ATP 水解能量引起构象变化时, 能引起 BtuC 在相应的自由度上运动增强, 改变其内部跨膜通道的维度并增强

BtuF 相应的运动, 从而最终完成底物的传递.

## 3 结论

本研究成功模拟了BtuC在POPC脂膜中的体系. 通过超过57 ns的 MD模拟和主成分分析,使得能从原子水平上了解BtuC的几种主要运动模式.结果表明,尽管BtuC的几种主要运动模式各不相同,但都实现了跨膜通道维度的改变,控制通道开口的打开和闭合.这些BtuC运动模式和与其相互作用的BtuF和BtuD的功能性运动能很好的偶合.BtuC的运动主要体现在周质一侧的区域,以控制跨膜通道在该侧开口的大小.MD模拟过程中,这一侧开口可以比晶体结构反映的"开放"状态更开放.在胞质一侧,并未观察到通道开口的明显变化,这一侧的运动可能需要在底物处于跨膜通道内时才发生.意外的是,尽管BtuC两个结构域具有相同的序列和类似的高级结构,但它们在运动上却有明显差异.这些结果有助于在原子水平上理解底物转运机制.

## 参考文献\_

- Schneider E, Hunke S. ATP-binding-cassette(ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing sub-units/domains. Fems Microbiol Rev, 1998, 22: 1—20[DOI]
- Abele R, Tampe R. Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. Biochim Biophys Acta-Biomembr, 1999, 1461: 405—419[DOI]
- Akabas M H. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-structure and function of an epithelial chloride channel. J Biol Chem, 2000, 275: 3729—3732[DOI]
- 4 Ehrmann M, Ehrle R, Hofmann E, et al. The ABC maltose transporter. Mol Microbiol, 1998, 29: 685—694[DOI]
- 5 Doerrler W T, Raetz C R H. ATPase activity of the MsbA lipid flippase of *Escherichia* coli. J Biol Chem , 2002, 277: 36697—36705[DOI]
- ovan Veen H W, Margolles A, Muller M, et al. The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site(two-cylinder engine) mechanism. Embo J, 2000, 19: 2503—2514[DOI]
- Gottesman M M, Fojo T, Bates S E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat Rev Cancer, 2002, 2: 48—58[DOI]
- 8 Chen J M, Cutler C, Jacques C, et al. A combined analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: implications for structure and disease models. Mol Biol Evol, 2001, 18: 1771—1788
- 9 Higgins C F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview. Res Microbiol, 2001, 152: 205—210[DOI]
- Jones P M, George A M. Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture. FEMS Microbiol Lett, 1999, 179: 187—202[DOI]
- Reyes C L, Chang G. Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP-vanadate and lipopolysaccharide. Science, 2005, 308: 1028—1031[DOI]
- 12 Dawson R J P, Locher K P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. Nature, 2006, 443: 180—185[DOI]
- 13 Locher K P, Lee A T, Rees D C. The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. Science,

- 2002, 296: 1091—1098[DOI]
- 14 Karpowich N K, Huang H H, Smith P C, et al. Crystal structures of the BtuF periplasmic-binding protein for vitamin B12 suggest a functionally important reduction in protein mobility upon ligand binding. J Biol Chem, 2003, 278: 8429—8434[DOI]
- 15 Davidson A L, Chen J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. Annu Rev Biochem, 2004, 73: 241—268[DOI]
- Ash W L, Zlomislic M R, Oloo E O, et al. Computer simulations of membrane proteins. Biochim Biophys Acta-Biomembr, 2004, 1666: 158—189[DOI]
- 17 Roux B, Schulten K. Computational studies of membrane channels. Structure, 2004, 12: 1343—1351[DOI]
- Oloo E O, Tieleman D P. Conformational transitions induced by the binding of MgATP to the vitamin B-12 ATP-binding cassette (ABC) transporter BtuCD. J Biol Chem, 2004, 279: 45013—45019[DOI]
- Tanizaki S, Feig M. Molecular dynamics simulations of large integral membrane proteins with an implicit membrane model. J Phys Chem B, 2006, 110: 548—556[DOI]
- 20 Ivetac A, Campbell J D, Sansom M S P. Dynamics and function in a bacterial ABC transporter: simulation studies of the BtuCDF system and its components. Biochemistry, 2007, 46: 2767—2778[DOI]
- Kundu S, Jernigan R L. Molecular mechanism of domain swapping in proteins: an analysis of slower motions. Biophys J, 2004, 86: 3846—3854[DOI]
- Wang Y M, Rader A J, Bahar I, et al. Global ribosome motions revealed with elastic network model. J Struct Biol, 2004, 147: 302—314[DOI]
- Jorgensen W L, Chandrasekhar J, Madura J D, et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. J Chem Phys, 1983, 79: 926—935[DOI]
- 24 Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. J Mol Graph, 1996, 14: 33—38[DOI]
- 25 Phillips J C, Braun R, Wang W, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. J Comput Chem, 2005, 26: 1781—1802[DOI]
- MacKerell A D, Bashford D, Bellott M, et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. J Phys Chem B, 1998, 102: 3586—3616[DOI]
- 27 York D M, Darden T A, Pedersen L G. The effect of long-range electrostatic interactions in simulations of macromolecular crystals- a comparison of the ewald and truncated list methods. J Chem Phys, 1993, 99: 8345—8348[DOI]
- 28 Lindahl E, Hess B, van der Spoel D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. J Mol Model, 2001, 7: 306—317
- 29 Amadei A, Linssen A B M, Berendsen H J C. Essential dynamics of proteins. Proteins, 1993, 17: 412—425[DOI]
- Pasenkiewicz-Gierula M, Murzyn K, Rog T, et al. Molecular dynamics simulation studies of lipid bilayer systems. Acta Biochim Pol, 2000, 47: 601—611
- Pandit S A, Chiu S W, Jakobsson E, et al. Cholesterol surrogates: a comparison of cholesterol and 16: 0 ceramide in POPC Bilayers. Biophys J, 2007, 92: 920—927[DOI]
- 32 Smaby J M, Momsen M M, Brockman H L, et al. Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol. Biophys J, 1996, 73: 1492—1505[DOI]
- 33 Hyslop P A, Morel B, Sauerheber R D. Organization and interaction of cholesterol and phosphatidylcholine in model bilayer-membranes. Biochemistry, 1990, 29: 1025—1038[DOI]
- Patra M, Salonen E, Terama E, et al. Under the influence of alcohol: the effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. Biophys J, 2006, 90: 1121—1135[DOI]
- 35 Rand R P, Parsegian V A. Hydration forces between phospholipid-bilayers. Biochim Et Biophy Acta, 1989, 988: 351—376
- 36 Gullingsrud J, Schulten K. Lipid bilayer pressure profiles and mechanosensitive channel gating. Biophys J, 2004, 86: 3496—3509[DOI]
- 37 Hvorup R N, Goetz B A, Niederer M, et al. Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. Science, 2007, 317: 1387—1390[DOI]
- 38 Ambudkar S V, Cardarelli C O, Pashinsky I, et al. Relation between the turnover number for vinblastine transport and for vin-

- blastine-stimulated ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. J Biol Chem, 1997, 272: 21160—21166[DOI]
- 39 Haider S, Grottesi A, Hall B A, et al. Conformational dynamics of the ligand-binding domain of inward rectifier K channels as revealed by molecular dynamics simulations: toward an understanding of Kir channel gating. Biophys J, 2005, 88: 3310—3320[DOI]
- 40 Grottesi A, Domene C, Hall B, et al. Conformational dynamics of M2 helices in KirBac channels: helix flexibility in relation to gating via molecular dynamics simulations. Biochemistry, 2005, 44: 14586—14594[DOI]
- 41 Cadieux N, Bradbeer C, Reeger-Schneider E, et al. Identification of the periplasmic cobalamin-binding protein BtuF of *Escherichia coli*. J Bacteriol, 2002, 184: 706—717[DOI]
- 42 Kandt C, Xu Z T, Tieleman D P. Opening and closing motions in the periplasmic vitamin B-12 binding protein BtuF. Biochemistry, 2006, 45: 13284—13292[DOI]
- Hollenstein K, Frei D C, Locher K P. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. Nature, 2007, 446: 213—216[DOI]
- Dawson R J P, Hollenstein K, Locher K P. Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. Mol Microbiol, 2007, 65: 250—257[DOI]