

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-24

**IN SILICO МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ
ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NAPI2B
В РАЗЛИЧНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ АНСАМБЛЯХ**

**IN SILICO MODELING OF THE SPATIAL STRUCTURE OF THE GLYCOSYLATED
SODIUM-DEPENDENT PHOSPHATE TRANSPORTER NAPI2B IN DIFFERENT LIPID MEMBRANES
AND THERMODYNAMIC ENSEMBLES**

Е. В. Медведев, Р. А. Власенкова, Н. А. Акберова

Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета

E. V. Medvedev, R. A. Vlasenkova, N. A. Akberova

Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

✉ e.m.vladimirovich2001@stud.kpfu.ru

Аннотация

Эпитоп MX35 большого внеклеточного домена NaPi2b — потенциальная мишень в таргетной терапии рака яичника. Его пространственная структура не разрешена экспериментально, поэтому цель работы — смоделировать ее поведение методом равновесной молекулярной динамики, провести анализ главных компонент и сетей взаимодействий аминокислот. В 6 системах показано влияние липидного состава и термодинамического ансамбля на подвижность и стабильность структуры белка.

Abstract

The MX35 epitope of the NaPi2b large extracellular domain is a potential target in ovarian cancer targeted therapy. Its spatial structure hasn't been solved experimentally, therefore, the aim of the study is to model its behavior by the method of equilibrium molecular dynamics, to analyze principal components and networks of interactions of amino acids. The effect of the lipid composition and thermodynamic ensemble on the mobility and stability of the protein structure is shown in 6 systems.

Экспрессия натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b (SLC34A2) на внешней поверхности опухолевых клеток коррелирует с наличием целого ряда онкологических заболеваний (прежде всего рака яичника), — это позволяет рассматривать его в качестве кандидата на роль перспективной мишени для таргетной терапии [1]. **Эпитоп MX35** большого внеклеточного домена (ВКД) этого белка связывается с моноклональными антителами — компонентами конъюгатов антитело — лекарственное средство, что дает возможность нацеливать химиотерапевтический препарат на онкоклетки.

В настоящее время пространственная структура SLC34A2 не разрешена экспериментально, в связи с чем мы использовали его AlphaFold2.0 [2] модель AF-O95436-F1-v4.

Ранее было отмечено [3], что транспортер в клетке представлен в гликозилированной форме. Запись O95436 базы данных UniProt содержит сведения о том, что в большом ВКД белка имеются 5 сайтов N-гликозилирования аминокислотных остатков (а. о.) — аспарагина в 295, 308, 313, 321 и 340-й позиции. При помощи онлайн-сервисов AlphaFold Server и CHARMM-GUI [4] в каждую из них мы ввели гликозильный фрагмент — пентаманнозид (мономер — α -1,4-D-манноза).

Основываясь на результатах предварительных экспериментов и данных научной литературы, для моделирования систем мы выбрали 2 термодинамических ансамбля: канонический NVT и изобарно-изотермический NPT, а также построили 3 варианта липидных бислоев: PMm [5], POPC 100, POPC 50 + POPE 50.

С помощью инструмента Membrane builder онлайн-сервиса CHARMM-GUI модель NaPi2b с введенными ранее в его большой ВКД гликозильными остатками поместили в смоделированные мембраны, которые затем упаковали в ортогональные водные ячейки размером $140 \text{ \AA} \times 140 \text{ \AA} \times 190 \text{ \AA}$ с добавлением ионов Na^+ и Cl^- в концентрации 0,15 М.

Поведение большого ВКД смоделировали с помощью 10 нс равновесной молекулярной динамики (МД) полученных систем в программном пакете NAMD 3 (Nightly build) [6] с использованием силовых полей CHARMM36m и CHARMM36. Подготовку к ней провели в 3 этапа: сначала осуществили минимизацию энергии (0,1 нс), далее — нагрев (310 К), затем — эквilibрацию системы (0,1 нс).

Визуализацию и сравнительный анализ траекторий МД провели с использованием VMD 1.9.3 [7] и RStudio 2025.05.0 Build 496 (версия R 4.5.0 [8], пакет Bio3d 2.4-5 [9]) по следующим параметрам: среднеквадратическому отклонению (RMSD); среднеквадратической флуктуации (RMSF); площади поверхности, доступной для растворителя (SASA); радиусу гирации (Rg); энергиям электростатических взаимодействий (E_{el}) и сил Ван-дер-Ваальса (E_{vdw}). Характер конформационного поведения большого ВКД определили анализом главных компонент (PCA). При помощи веб-сервера RING 4.0 [10] создали сети межостаточных взаимодействий в белковых структурах, для количественного сравнения которых использовалась агрегативная иерархическая кластеризация и рассчитывалась кофенетическая корреляция. Для статистической обработки результатов использовали критерии Крускала — Уоллиса и Вилкоксона с поправкой Бонферрони.

В ходе проведенного исследования получили подтверждение рабочей гипотезы о том, что липидный состав мембраны влияет на RMSD, RMSF а. о. белка, большого ВКД и **эпитопа MX35**; E_{el} и E_{vdw} а. о. белка (подвижность и стабильность), а также были отвергнуты нулевые гипотезы о влиянии липидного состава мембраны на SASA, Rg а. о. большого ВКД и **эпитопа MX35** (компактность). Сравнительный анализ пар систем с различным термодинамическим ансамблем, совпадающих по липидному составу плазматической мембраны, показал значимое изменение RMSD, RMSF, E_{el} и E_{vdw} .

Полученные результаты PCA симуляций с ансамблем NPT свидетельствуют о том, что характер конформационного поведения большого ВКД (в т. ч. и **эпитопа MX35**) по трем главным компонентам определяется по исследуемым системам максимальной подвижностью а. о. Asn256, **Gly332** и минимальной подвижностью а. о. Phe254; флуктуации а. о. (полипептидного остова — C_{α} -атомов) по 1-й и 2-й главным компонентам во всех системах не различаются, а по 3-й главной компоненте — различаются в паре PMm-POPC 100.

Анализ сетей межостаточных взаимодействий показал, что только в системе POPC 50 + POPE 50 в **эпитопе MX35** большого ВКД были обнаружены а. о. с высокими значениями параметра центральности по концентрированию (топ 10 %): **Val314**, **Trp329** и **Trp336**, а также **Thr337**. Полученные в ходе анализа структурного сходства сетей взаимодействия а. о. значения кофенетической корреляции не превышают 0,45, что может указывать на существенные различия в топологической организации сетей взаимодействий в различных липидных окружениях.

Литература

1. Nurgalieva N. K., Popov V. E., Skripova V. S. et al. Sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b as a potential predictive marker for targeted therapy of ovarian cancer // *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2021. Vol. 28. Art. 101104.
2. Jumper J., Evans R., Pritzel A. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // *Nature*. 2021. Vol. 596. P. 583–589.
3. Reshetnikova D., Bulatova L. F., Skripova V. et al. Effect of disulfide bonds and N-glycosylation on the recognition of the NaPi2b transporter by monoclonal antibodies // *Annals of Oncology*. 2022. Vol. 33. Art. S1408.
4. Jo S., Kim T., Iyer V. G. et al. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM // *Journal of Computational Chemistry*. 2008. Vol. 29. P. 1859–1865.
5. Pogozheva I. D., Armstrong G. A., Kong L. et al. Comparative molecular dynamics simulation studies of realistic eukaryotic, prokaryotic, and archaeal membranes // *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2022. Vol. 62. P. 1036–1051.
6. Phillips J. C., Hardy D. J., Maia J. D. C. et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD // *Journal of Chemical Physics*. 2020. Vol. 153. Art. 044130.
7. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics // *Journal of Molecular Graphics*. 1996. Vol. 14. P. 33–38.
8. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing // R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2025.
9. Grant B. J., Rodrigues A. P., ElSawy K. M. et al. Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures // *Bioinformatics*. 2006. Vol. 22. P. 2695–2696.
10. Conte A. D., Camagni G. F., Clementel D. et al. RING 4.0: faster residue interaction networks with novel interaction types across over 35,000 different chemical structures // *Nucleic Acids Research*. 2024. Vol. 52. P. W306–W312.