

Литература

1. Zhou Y. and Karplus M. "Interpreting the folding kinetics of helical proteins." Nature 401(6751): 400-403 (1999).
2. Wako, H., J. An, et al. "Environment-dependent and position-specific frequencies of amino acid occurrences in alpha-helices." Chem-Bio Informatics Journal 3(2): 58-77. (2003).
3. Kale L., Skee R., Bhandarkar M., Brunner R., Gursoy A., Krawetz N., Phillips J., Shinozaki A., Varadarajan K., and Schulten K.. NAMD2: Greater scalability for parallel molecular dynamics. J. Comp. Phys., 151, 283-312, (1999).
4. Костиков А.П. Применение метода молекулярного динамического моделирования в биофизике. Сборник "Пошуки і знахідки", Выпуск 3, Славянск, СГПУ, 2004, стр. 7-9.
5. Костиков А.П., Медведева И.В. Исследование разворачивания белков при механических возмущениях. Сборник "Пошуки і знахідки", Выпуск 9, том 4, Славянск, СГПУ, 2009, стр. 112-117.

Худько В.В., Костиков А.П.

¹Студентка 5 курса группы 5М–2 физико-математического факультета СГПУ,
²Доцент кафедры физики СГПУ

Исследование сворачивания-разворачивания белков термофильных организмов с использованием метода Управляемой Молекулярной Динамики

При выяснении многих вопросов о функциях белков, нарушениях этих функций приходится выяснять большой круг вопросов, относящихся к структуре белка. Представления о первичной, вторичной, третичной структуре молекулы белка позволяют упорядочить массив вопросов о связи структуры белка и его функции, но сами вопросы чаще всего остаются без ответа. В частности, нет четкого понимания, почему некоторые организмы способны нормально функционировать при экстремальных условиях (очень низких или очень высоких температурах, высоких давлениях и т.п.). Ясно, что тщательное изучение всех компонентов таких организмов представляет безусловный интерес.

В нашей работе исследовался один из белков (1csp), входящий в состав термофильных организмов /1/. Наиболее яркой особенностью этого белка является его пространственная структура – набор элементов β -структуры без каких-либо признаков спиральных структур.

В качестве метода исследования использован метод молекулярно-динамического моделирования (МДМ). Мы использовали программу моделирования NAMD /2/. Метод исследования, выбранный нами в рамках МДМ – управляемая молекулярная динамика (УМД), позволяет воздействовать механически не любые участки молекулы. При механическом воздействии положение одного из атомов молекулы фиксировалось, этот атом в дальнейшем был неподвижен. Механическое воздействие прикладывается к любому другому атому молекулы, т.е. он может изменять свое положение полностью контролируемым способом, – этот атом называют управляемым. В программе NAMD возможны два способа управления движением управляемого атома: постоянная скорость или постоянная сила, приложенная к этому атому. В том и другом случае в процессе симуляции молекула растягивается по заданному алгоритму, в конце процесса растягивания участок молекулы между двумя упомянутыми атомами становится линейным. Наблюдение за деталями процесса растягивания дает уникальную информацию о внутримолекулярных силах, аналогично информации получаемой методом атомной силовой микроскопии.

Процедура подготовки молекулы к компьютерному моделированию (симуляции) динамики проводилась по нашей стандартной методике /3/. Процедуры УМД были аналогичны процедурам, разработанным нами ранее /4/.

На рис.1 показаны результаты одного из наших экспериментов. В этом эксперименте растягивающая сила 500 пН приложена к атому C_{α} последнего аминокислотного остатка. Атом C_{α} первого аминокислотного остатка оставался неподвижным. Из рисунка видно, что расстояние между этими атомами увеличивалось до максимального значения порядка 230Å. Это максимальное расстояние соответствовало полностью вытянутой полипептидной цепочке белка. Как видно из рисунка в процессе растягивания молекулы наблюдается не просто гладкая линейная зависимость. Можно заметить, что в двух областях графика увеличение расстояния между концами молекулы не наблюдалось при наличии постоянной растягивающей силы, на графике при этом наблюдались небольшие «ступеньки».

Для последующего анализа наших результатов использовались несколько методов наблюдения за одним и тем же процессом. В данном случае мы считали полезным воспользоваться понятием «контакты»: количество контактов, сумма расстояний между всеми контактами молекулы. Это особенно важно, поскольку наблюдение за динамикой контактов является общепринятой методикой в работах по изучению молекулярной динамики. По определению, *контактом* между атомами C_{α} - C_{α} называют такие два α -углеродных атома основной цепи молекул, которые не являются соседними вдоль цепи, и расстояние между которыми не превышает заданной величины. Как правило, эта величина составляла 5,4 Å. На рис.2 показана зависимость от времени количества контактов в молекуле.

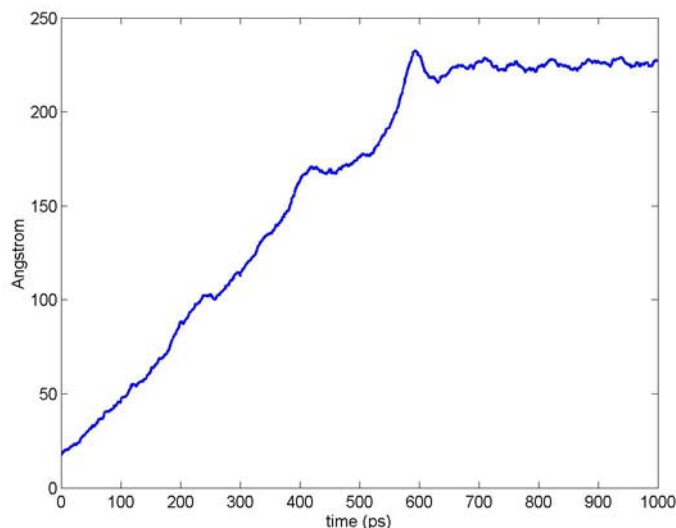


Рис.1. Зависимость расстояния между неподвижным и управляемым атомом от времени для молекулы 1csp в воде. Растяжение молекулы проводили с постоянной силой 440 пН.

Как видно из рис.2 после 550 пс количество контактов в молекуле равнялось нулю, т.е. к этому моменту времени пространственная структура белка была полностью разрушена.

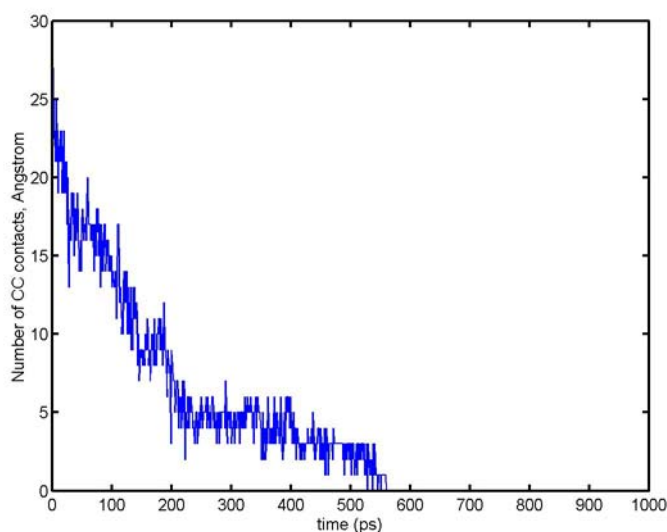


Рис.2. Зависимость от времени количества контактов $C\alpha-C\alpha$. Остальные условия как на рис.1.

При анализе результатов экспериментов при разных значениях растягивающей силы нам удалось установить, что молекула в процессе разворачивания проходит через два промежуточных состояния с повышенной устойчивостью к действию внешних возмущений. В результате такого анализа стало ясно, что в первом промежуточном состоянии несмотря на действие растягивающей силы центральная часть молекулы оставалась упакованной

компактно (не нарушалась пространственная β -структура). Нарушения пространственной структуры наблюдались только для нескольких аминокислотных остатков на С-конце и на N-конце полипептидной цепочки белка. Наглядно это можно видеть на рис.3. На рисунке 3 показаны не только неподвижный и управляемый атом, но и те аминокислотные остатки вблизи С-конца и N-конца, которые разделяют неизменившуюся часть молекулы от изменившейся (растянутой).

Во втором промежуточном состоянии развернута вся полипептидная цепочка белка кроме небольшого центрального фрагмента β -структуры – β -шпильки. На рис.3 этот фрагмент представлен в виде широких лент в середине рисунка.

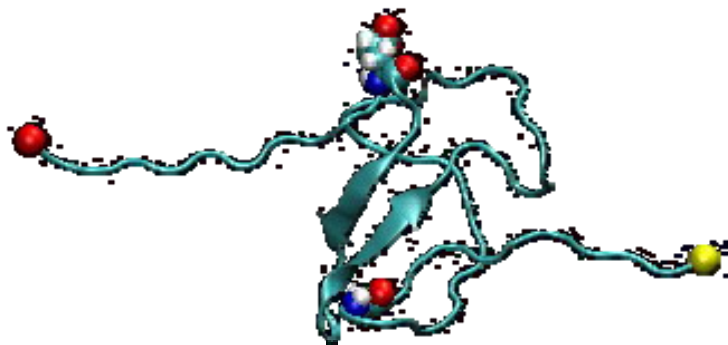


Рис.3. Пространственная структура молекулы белка 1csp после растягивания с силой 375 пН в течение 600 пс. Неподвижный и управляемый атомы показаны в виде сфер, для 12-го и 57-го аминокислотных остатков показаны все их атомы (кроме водорода), остальная часть молекулы показана сплошной лентой.

В последующих экспериментах мы выясняли степень устойчивости найденных нами промежуточных состояний при воздействии не только механических возмущений, но и высокой температуры. В результате нам удалось показать, что повышение температуры не приводит к существенным изменениям динамики структуры молекулы. Оба промежуточных состояния можно регистрировать и при высокой температуре.

Очень интересно сравнить наши результаты с результатами аналогичного исследования белка 1bdd с высоким содержанием α -структуры (Мазурина, 2010). Оказалось, что для белка 1bdd также можно выбрать условия, в которых наблюдается относительно стабильное промежуточное состояние при разворачивании молекулы. Как выяснилось в упомянутой работе стабильность промежуточного состояния белка с высоким содержанием α -структуры обусловлена взаимодействием трех α -спиралей друг с другом, т.е. взаимодействием типичным для β -структур.

Таким образом, из нашей работы можно сделать вывод, что высокая стабильность белка Icsr из термофильного организма обусловлена именно высоким содержанием β -структур в этом белке.

Литература

1. Bono S., Riechmann L., Girard E., Williams R.L., Winter G. "A segment of cold shock protein directs the folding of a combinatorial protein." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102, 1396-1401 (2005).
2. Kale L., Skee R., Bhandarkar M., Brunner R., Gursoy A., Krawetz N., Phillips J., Shinozaki A., Varadarajan K., and Schulten K.. NAMD2: Greater scalability for parallel molecular dynamics. J. Comp. Phys., 151, 283-312, (1999).
3. Костиков А.П. Применение метода молекулярного динамического моделирования в биофизике. Сборник "Пошуки і знахідки", Выпуск 3, Славянск, СГПУ, 2004, стр. 7-9.
4. Костиков А.П., Медведева И.В. Исследование разворачивания белков при механических возмущениях. Сборник "Пошуки і знахідки", Выпуск 9, том 4, Славянск, СГПУ, 2009, стр. 112-117.