

Бутенко Р.А., Костиков А.П.

¹Студент 5 курса группы 5М–2 физико-математического факультета СГПУ,

²Доцент кафедры физики СГПУ

Исследование роли гидрофобных взаимодействий для устойчивости бета-шпильки методом МДМ с использованием УМД

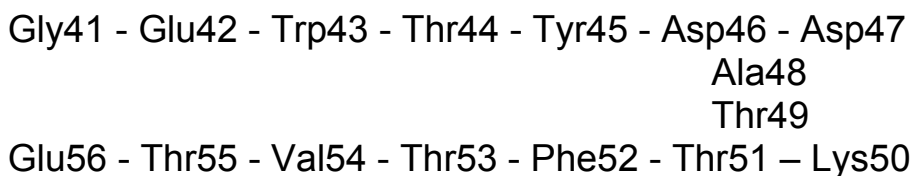
Процессы, приводящие к самопроизвольному сворачиванию молекул белков в нормальные, естественные («нативные») структуры, происходят в живых клетках непрерывно и безошибочно. Любые отклонения конечной структуры белка от «нативной», приводят к нарушению его функциональных свойств. В белках выделяют три типа регулярной вторичной структуры: спираль, бета-лист и изгиб. Частота, с которой эти несколько элементов вторичной структуры обнаруживаются в свернутых (нативных) белках, привела к тому, что многие исследователи занялись поиском моделей систем, в которых хорошо опознаваемая вторичная структура наблюдается при отсутствии третичной структуры. Такие системы обеспечивают возможность отделить существенные свойства вторичной структуры белка от эффектов третичной структуры.

Одна из наиболее удачных моделей – β -шпилька из белка G (2gb1). Первоначально эту модель удалось найти биохимикам, причем было надежно показано, что этот фрагмент молекулы белка в пробирке способен к обратимому разворачиванию-сворачиванию в нативную структуру. Затем последовал ряд работ, в которых процессы разворачивания-сворачивания β -шпильки изучались параллельно традиционными методами исследования и методами компьютерного моделирования динамики молекул. В результате было получено достаточно много интересных данных, имеющих отношение к раскрытию механизма самосборки β -структур /1/. В последнее время появилась возможность наблюдать за процессом разворачивания полипептидной цепочки молекулы при механическом воздействии. Это либо экспериментальный метод Атомной Силовой Микроскопии (АСМ), либо один из вариантов метода моделирования динамики – управляемая молекулярная динамика (УМД). Метод АСМ на сегодняшний день имеет еще очень много ограничений и не может применяться к маленьким молекулам. Для метода УМД ограничений не существует. Поэтому мы воспользовались последним методом для исследования β -шпильки. Особое внимание при этом мы уделяли гидрофобным взаимодействиям в исследуемом полипептиде.

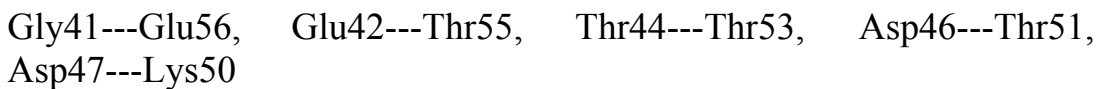
Многими экспериментами (см., например ссылки в /1/) показано, что фрагмент этого белка из 16 аминокислотных остатков имеет вторичную

структуру β -шпильки, совпадающую со структурой этого фрагмента в составе белка. Показано также, что исследуемая β -шпилька стабилизируется водородными связями между противоположащими аминокислотными остатками и гидрофобными взаимодействиями между двумя парами остатков: Trp43—Val54 и Tyr45—Phe52. Нашей целью было выяснить роль гидрофобных взаимодействий в стабилизации структуры β -шпильки. Для этого мы воспользовались методом мутаций – замены одних остатков на другие. Исследование динамики структуры выполнялось методом молекулярно-динамического моделирования (МДМ) /2/ с использованием процедур управляемой молекулярной динамики (УМД).

Схематически первичную и вторичную структуры исследуемой молекулы можно представить в виде шпильки, на свободных концах которой находятся аминокислотные остатки Gly41 (N-конец) и Glu56 (C-конец). Аминокислотные остатки Asp47, Ala 48, Thr49 и Lys50 образуют область изгиба шпильки:



В равновесных условиях при комнатной температуре представленная форма β -шпильки молекулы стабилизируется водородными связями между противоположными остатками:



Кроме водородных связей, стабильность β -шпильки, в соответствии с литературными данными, обеспечивают гидрофобные связи между боковыми группами неполярных гидрофобных аминокислотных остатков: Trp43----Val54, Tyr45----Phe52.

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

Наблюдение за процессами изменения пространственной структуры молекулы осуществляли несколькими способами. Один из них – выявление *контактов* в молекуле и последующее наблюдение за контактируемыми атомами молекулы. По определению, *контактом* между атомами $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\alpha$ называют такие два альфа-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.

В большинстве наших экспериментов фиксировалось положение $\text{C}\alpha$ 41-го аминокислотного остатка, а растягивающую силу прикладывали к атому $\text{C}\alpha$ 56-го аминокислотного остатка. Направление приложенной силы выбиралось вдоль прямой, соединяющей указанные атомы.

На рис.1 показаны некоторые результаты одной из серий наших экспериментов по УМД β -шпильки и ее мутанта, в котором аминокислотные остатки Trp43, Val54, Tyr45, Phe52 заменены на аланин (Ala). Тем самым было резко уменьшены гидрофобные взаимодействия соответствующих пар остатков.

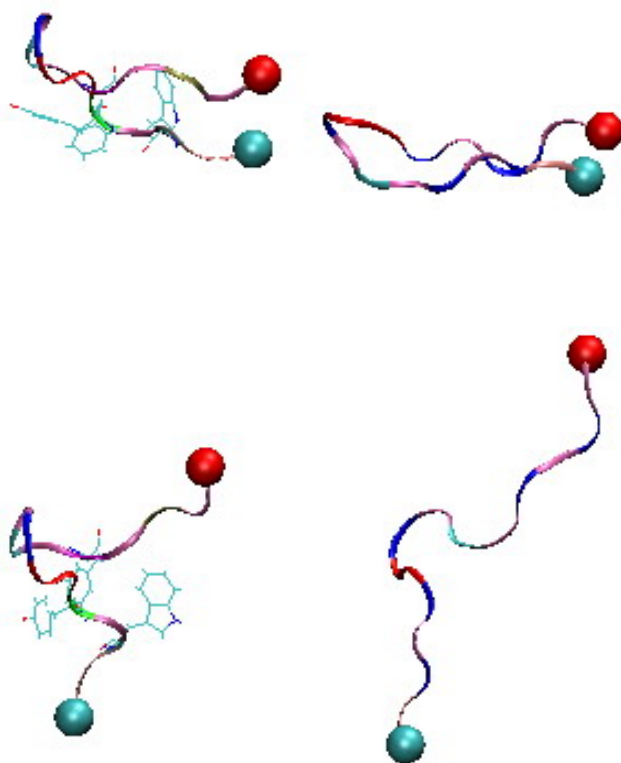


Рис.1. Растягивание β -шпильки (слева) и ее мутанта (справа) в воде с постоянной силой 200 пН, температура – 300К. Неподвижный атом – C_{α} 41 аминокислотного остатка, управляемый атом – C_{α} 56 аминокислотного остатка, оба эти атома показаны в виде сфер Ван дер Ваальса. Вверху – молекулы до начала разворачивания, внизу – через 300 пс. Рисунок получен с помощью программы VMD /3/.

Из рисунка хорошо видно, что при одинаковых условиях мутантная молекула разворачивается быстрее, чем ее нативный аналог. Этот вывод подтверждается и нашими наблюдениями за характером зависимости расстояний между атомами C_{α} - C_{α} контактов от времени. На рис.2 такие зависимости показаны для молекулы-мутанта. Хорошо видно, что все контакты разрушаются практически одновременно, тогда как в нативной шпильке это происходило последовательно, причем с задержками на тех парах C_{α} - C_{α} , которые соответствовали парам остатков, связанных гидрофобным взаимодействием. Это означает, что гидрофобные взаимодействия способны эффективно противодействовать разворачиванию молекулы.

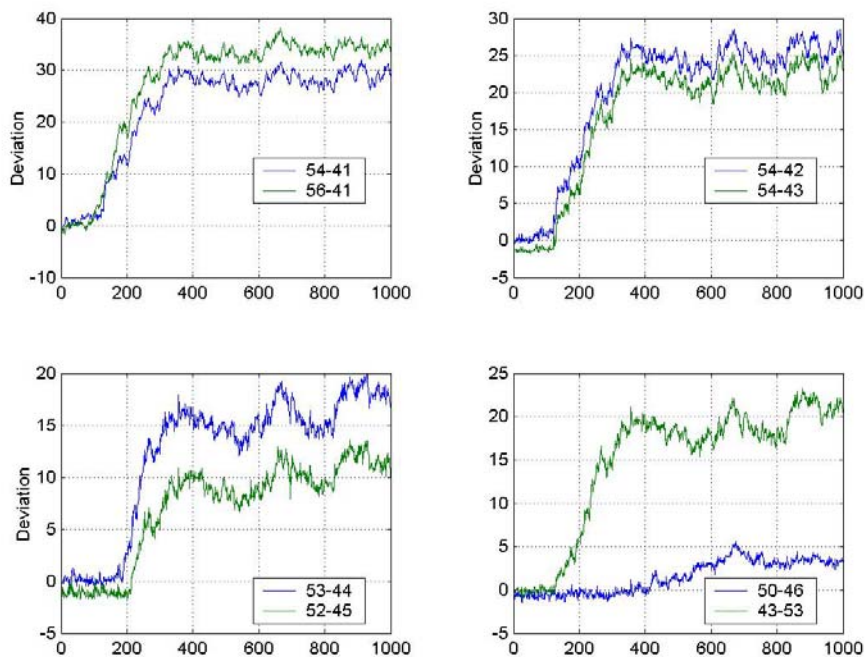


Рис.2. Зависимость отклонений (Deviation) расстояний C_{α} - C_{α} от 5,4 Å между указанными атомами углерода мутанта β-шпильки из белка 2gb1 в водт при 300 К от времени (пикосекунд). Растяжение молекулы производили с постоянной силой 200 пН.

Таким образом, наши результаты позволяют утверждать, что именно гидрофобные взаимодействия являются ключевыми, ответственными за стабильность β-шпильки. Роль водородных связей в исследованной нами молекуле, видимо, сводится скорее к поддержанию конечной структуры, к регулировке деталей этой структуры.

Литература

1. *Espinosa J.F., Syud F.A., Gellman S.H.* "Analysis of the factors that stabilize a designed two-stranded antiparallel β-sheet". *Protein Sci.* 11:1492–1505. (2002).
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. *Humphrey W., Dalke A., Schulten K.* VMD – "Visual Molecular Dynamics". *J.Molec.Graphics*, 14.1, 33-38, (1996).
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.