

Кривошеенко Д.А., Костиков А.П.

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

Исследование промежуточных состояний самосборки белков методами моделирования молекулярной динамики

Выяснение механизма самоорганизации белка чрезвычайно важно для понимания молекулярной биологии клетки, является ключом для понимания того, как код линейной ДНК превращается в клеточную функцию при сборке активного белка-фермента.

Проблема самоорганизации белка в трехмерную структуру до сих пор не решена. Какие вопросы составляют эту проблему? Один из главных вопросов – понять, каким образом одномерная цепочка первичной структуры белка задает трехмерную структуру молекулы. Поиск алгоритмов, управляющих процессом самосборки белка, привел к пониманию того, что этот сложный процесс, в который вовлечено большое число атомов молекулы белка, глобально должен быть энергетически выгодным. В результате сформировалась идея о необходимости учитывать характер рельефа поверхности потенциальной энергии белка. Первоначально в своих теоретических работах многие авторы подразумевали, что процесс самосборки всегда проходит через определенные промежуточные состояния так, что весь процесс перестройки пространственной структуры молекулы обеспечивается последовательным перебором таких *промежуточных состояний*, каждое последующее из которых энергетически более выгодно, чем предыдущее.

Поиском промежуточных состояний были заняты многие экспериментаторы и теоретики /1/. В результате появился целый ряд моделей самосборки белков, в которых обращалось внимание на разные аспекты процессов пространственной организации длинной полипептидной цепочки белка. Эти модели не потеряли своей актуальности, более того, их дальнейшее развитие происходит и сегодня.

В нашей работе исследовалось промежуточное состояние разворачивания молекулы белка убихитина при воздействии механических сил.

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 фиксируется, этот атом в дальнейшем

неподвижен. Второй атом, управляемый, изменяет свое положение полностью контролируемым способом. 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 динамики молекулы, она 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 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 C α -C α 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.

Из предварительных экспериментов /4/ было установлено, что если фиксировать положение атома C α 48-го аминокислотного остатка, а растягивающую силу приложить к атому C α 76-го аминокислотного остатка убихитина, можно наблюдать промежуточное состояние разворачивания молекулы. Это состояние наблюдалось до 200-300 пс. В наших экспериментах анализировалось не только зависимость от времени расстояния между неподвижным и управляемым атомом (стандартный подход в методе УМД), но и другие параметры молекулы. В частности, на рис.1 показана зависимость от времени суммы расстояний контактов. Видно, что этот параметр оставался практически постоянным до 250 пс и только после этого начинал расти. Это означает, что не только вторичная, но и третичная структура белка в промежуточном состоянии оставались близкими к нативной структуре вплоть до 250 пс несмотря на действие постоянной растягивающей силы. Существенное нарушение структуры происходило только после момента времени 250 пс.

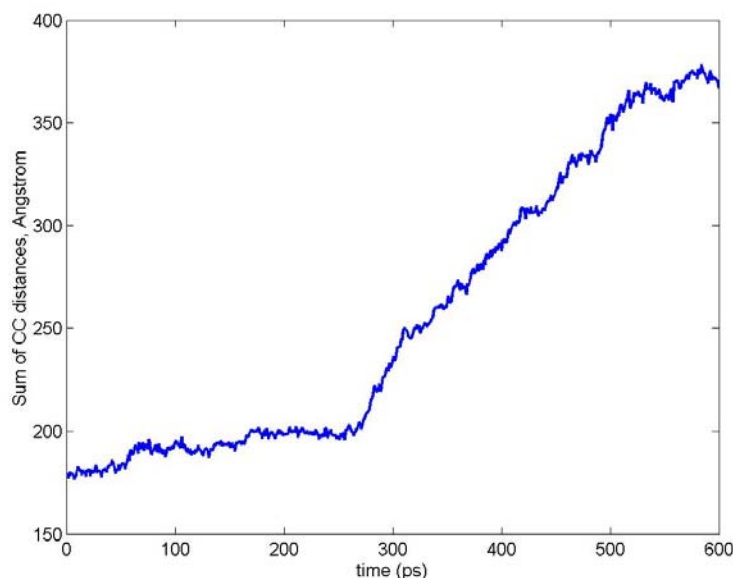


Рис.1. Зависимость от времени суммы расстояний между атомами C α -C α молекулы белка убихитина, подчиняющимся критерию «контакт». Растяжение молекулы проводили с постоянной силой 500 пН, температура – 300К. Неподвижный атом – C α 48 аминокислотного остатка, управляемый атом – C α 76 аминокислотного остатка.

Как видно из рисунка в представленной зависимости имеется достаточно протяженный участок, на котором приложенная постоянная сила растягивания не приводила к заметному разворачиванию молекулы. Этот участок соответствует промежуточному состоянию процесса разворачивания молекулы. Более подробное изучение позволило понять характер промежуточного состояния.

Во многих экспериментах этой серии можно было заметить, что после 500-600 пс перестройка пространственной структуры молекулы завершалась и в дальнейшем молекула оставалась неизменной. Полезную информацию о динамике пространственной структуры молекулы дает рис.2. На нем изображена зависимость от времени количества контактов в молекуле белка. Видно, что в начальный момент это количество составляло около 25-30 контактов, в конце периода наблюдения количество контактов уменьшалось до 15. Как выяснилось, оставшиеся контакты находятся в тех частях молекулы, которые не подвергались возмущениям в наших экспериментах. Это означает, видимо, что отдельные участки молекулы белка способны независимо образовывать нативную структуру. Эта независимость пространственной структуры разных участков молекулы белка является хорошим подтверждением одной из гипотез о механизме сворачивания-разворачивания белков. В соответствии с этим механизмом сначала образуются вторичные структуры белка (спиральные участки и β -структуры), а затем эти структуры объединяются в единую компактную третичную структуру.

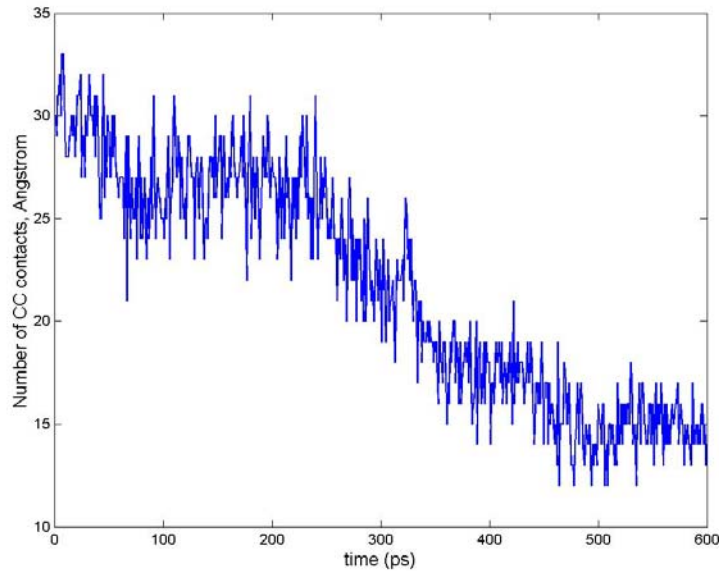


Рис.2. Зависимость от времени количества контактов Ca-Ca,.
Остальные условия как на рис.1.

В последующих сериях экспериментов мы выясняли, как влияют внешние условия на стабильность промежуточного состояния. Наиболее интересны, на наш взгляд, результаты изучения таких зависимостей от температуры. Мы выполнили несколько серий экспериментов, в которых процедура механического растягивания молекулы совмещалась с увеличением температуры образца.

Хорошо известно, что повышение температуры приводит к разрушению пространственной структуры молекул белков, причем этот процесс, как правило, затрагивает одновременно все участки молекулы белка. Насколько нам известно, выполнить в реальных условиях, с использованием атомного силового микроскопа, растяжение молекулы при произвольной температуре не представляется возможным по техническим причинам. Компьютерный эксперимент свободен от таких ограничений.

Из наших результатов исследований промежуточного состояния при разных температурах следует, что это состояние при повышении температуры становится менее стабильным.

Обнаружено, что после 300 пс количество контактов, для которых по-прежнему выполняется критерий «контакта», уменьшается от среднего значения 25 до 10. Интересно, что количество контактов к концу симуляции не равно нулю, т.е. несмотря на экстремальные условия, некоторые участки молекулы белка оставались нативными, неповрежденными. Сравнивая этот результат с результатами аналогичных наблюдений, но без участия методики управляемой молекулярной динамики, можно заметить, что без применения методики УМД при высокой температуре молекула быстро теряет все нативные контакты. Причины такого различия будут выясняться в последующих работах.

Литература

1. Onuchic, J.N., Luthey-Schulten, Z., and Wolynes, P.G. (1997) Theory of protein folding: The energy landscape perspective. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 48, 545-600.
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.

Кулик А.В., Костиков А.П.

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

Исследование когерентной динамики белков

Компьютерное моделирование молекулярной динамики биополимеров в настоящее время широко используются для изучения их свойств, структуры, динамики и термодинамики. В частности, был предложен и развит метод изучения когерентных свойств атомных осцилляторов белка, в котором молекула подвергается кратковременным возмущениям, а затем наблюдается отклик системы. Метод называют температурным эхо.

Суть явления заключается в следующем. Движение атомов в глобулярных белках можно описать как набор слабо взаимодействующих гармонических осцилляторов. При этом линейные суперпозиции сходных атомных осцилляторов образуют так называемые нормальные моды. Поскольку в нормальных модах участвуют индивидуальные атомные колебания разных частей молекулы, то можно говорить о делокализации нормальных мод по всему белку. Экспериментально существует возможность синхронизации, через соответствующее возмущение, этих нормальных мод, переводя систему в так называемое фазовое когерентное состояние, в котором нормальные моды колеблются в фазе. Степень когерентности системы может быть определена вторым сигналом, который, интерферируя с когерентными нормальными модами, может привести к резонансам, которые называют эхо и могут регистрироваться экспериментально.

Целью данной работы было исследование особенностей динамики исследуемых молекул белков в условиях возбуждения в них когерентных