

На правах рукописи

Федик Игорь Викторович

ДИНАМИКА СТРУКТУРНОЙ САМООРГАНИЗАЦИИ
МОДЕЛЬНЫХ БИОПОЛИМЕРОВ

Специальность 03.00.02. - "Биофизика"

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2008

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор
Шайтан Константин Вольдемарович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор
Севастьянов Леонид Антонович
(Факультет физико-математических и
естественных наук РУДН)

кандидат химических наук, с. н. с.
Чилов Гермес Григорьевич
(Институт физико-химической биологии
им. А. Н. Белозерского, МГУ)

Ведущая организация: Институт химической физики
им. Н. Н. Семёнова РАН, г. Москва

Защита состоится " 17 " апреля 2008 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова по адресу: 119992, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория "Новая".

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан: " " февраля 2008 г.

Учёный секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук,
профессор

Т. Е. Кренделева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Биологические полимеры участвуют во всех основных процессах в живом организме. При всем их разнообразии, работа биомакромолекул обычно базируется на высоко специфическом взаимодействии типа ключ - замок. Для этого необходима достаточно жесткая пространственная структура. Поэтому правильное функционирование белков, ДНК и РНК тесно связано с их трехмерной структурой. Даже небольшие изменения этих структур, как правило, ведут к утере или резкому изменению активности. Базовые принципы специфического сворачивания (фолдинга) биомакромолекул и строения их энергетической поверхности исследуются весьма интенсивно как в России, так и за границей (О.Б. Птицын, А.В. Финкельштейн, Е.И. Шахнович, М. Karplus, P.G. Wolynes, Y. Levy, J. Jortner, O.M. Becker, В.А.Аветисов, К.В.Шайтан и др.). Каждая биополимерная цепь способна сформировать практически бесчисленное множество устойчивых пространственных конфигураций, хотя функциональной активностью может обладать лишь одна из них, которая называется нативной. С учетом средней скорости перемещения атомов в молекуле белка при нормальных условиях для нахождения единственной нативной конформации путем случайного перебора всех устойчивых состояний может не хватить времени жизни всей Вселенной. Эта проблема известна как парадокс Левинтала.

Для разрешения этого парадокса были предложены две не противоречащие концепции. Согласно одной из них, фолдинг начинается с формирования относительно жестких элементов вторичной структуры, из которых далее собирается третичная структура биополимера (Fersht и др., 1985; Ptitsyn, Finkelstein, 1983; Murzin, Finkelstein, 1988; Rumbley и др., 2001; Zhou, Karplus, 1999). Таким образом, фолдинг представляет собой последовательный процесс, на каждом этапе которого уменьшается эффективный объем доступной области конфигурационного пространства,

вследствие чего задача поиска функционально активной конформации существенно упрощается (Levy и др., 2001).

Позже была предложена концепция воронкообразного энергетического ландшафта. Согласно этой теории гиперповерхность конформационной свободной энергии имеет глобальный или локальный минимум, который соответствует нативной конформации биомакромолекулы. (Zhou, Karplus, 1999; Guo и др., 1997; Dill, Chan, 1997; Soccì и др., 1998). При таком ландшафте свободной энергии система за счет релаксации должна самопроизвольно переходить в нативное состояние независимо от начальной конфигурации (Sali и др., 1994; Zhou, Karplus, 1999; Hubner и др., 2006; Guo и др., 1997; Dill, Chan, 1997). Однако в моделях, опирающихся на данную теорию в силу кинетических ограничений подобная релаксация происходит за времена от десятков наносекунд для коротких пептидов, до миллисекунд для белков и длинных пептидов. Для детализированных моделей расчеты в таком масштабе времени являются весьма ресурсоемкой задачей.

Классическая и более новая схемы процесса фолдинга не противоречат друг другу. Поведение молекулы в соответствии с двумя данными концепциями можно наблюдать и в рамках одной модели.

Необходимость развития теории пространственной укладки и, в последствии, функции белков и нуклеиновых кислот делает разработку модельного динамического подхода к проблеме фолдинга весьма актуальной.

Целью работы является изучение методом молекулярной динамики закономерностей структурной самоорганизации в модельных биополимерах, происходящей за короткие времена (десятки и сотни пикосекунд), выяснение детерминированности процессов последовательных структурных перестроек и их зависимости от начальной конфигурации.

Постановка задачи.

Необходимо поставить и решить следующие задачи:

- Изучить влияние начальной конфигурации на ход структурной самоорганизации и конечную пространственную укладку модельного

биополимера

- Исследовать зависимость типа конечной пространственной укладки модельной полимерной цепи от параметров взаимодействия между ее звеньями.
- Разработать модельную молекулярную конструкцию, способствующую формированию полимерной цепью регулярной пространственной конфигурации определенного типа.
- Сравнить поведение упрощенных и полноатомных моделей биополимеров с точки зрения процесса структурной самоорганизации.

Научная новизна.

Впервые методом молекулярной динамики был исследован процесс быстрой структурной самоорганизации простой модельной гомополимерной цепи из леннард-джонсовских частиц с формированием регулярных пространственных конфигураций. Было обнаружено, что в такой модельной системе могут самопроизвольно формироваться структурные элементы различных типов, некоторые из них имеют геометрическое сходство с элементами вторичной структуры белков и нуклеиновых кислот. Формирование регулярных пространственных укладок в малом временном масштабе наблюдается только при определенных начальных конфигурациях. Показано, что тип конечной структуры зависит от соотношения двух параметров взаимодействия: длины связей между звеньями и эффективного леннард-джонсовского радиуса мономерных звеньев.

Впервые была разработана модельная молекулярная система, способствующая специфическому сворачиванию упрощенной модельной полимерной цепи. Данная система была представлена нанотрубкой, специфически взаимодействующей с линейным полимером. При определенных параметрах взаимодействия, полимерная цепь, проходя через нанотрубку, разворачивается, а затем формирует новую упорядоченную структуру. Показано, что система функционирует только при определенном строении гиперповерхности потенциальной энергии взаимодействия нанотрубки с цепочкой.

Была продемонстрирована возможность быстрого фолдинга в компактную конформацию α -спирали полноатомной модели пептида додекаланина (Ala_{12}) в вакууме при старте из вытянутой конфигурации β -нити. Показано, что при сворачивании полиаланин претерпевает ту же последовательность элементарных структурных перестроек, что и упрощенная модельная полимерная цепь.

Проведены численные эксперименты по денатурации белка альбегетина во внешнем силовом поле, разводящим N- и C- концевые участки цепи. были исследованы внутренние силы, ответственные за формирование вторичной структуры и третичной структуры полипептида Ala_{12} и. Продемонстрировано, что зависимость конечного удлинения альбегетина, что говорит об иерархии энергий взаимодействия между различными элементами структуры белка.

Практическая значимость.

Результаты исследований позволяют расширить представления о процессах фолдинга и могут быть использованы для предсказания конформации биополимеров и молекулярного дизайна биологических систем, а также интерпретации результатов экспериментов деформации белковых структур в атомно-силовой микроскопии.

Достоверность результатов диссертации обеспечивается использованием универсальных законов и уравнений механики и проведением тестовых расчетов систем, сравниваемых с экспериментальными данными.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Структурная самоорганизация модельных биополимеров может протекать как ряд последовательных структурных перестроек, зависящих от начальной пространственной конфигурации цепи.

2. Тип регулярной пространственной укладки модельных биополимеров зависит от отношения длин связей между последовательными звеньями в цепи и эффективных Ван-дер-ваальсовых радиусов мономерных звеньев в их

составе.

3. Конформации, реализуемые при сворачивании пептидов из вытянутой конфигурации проявляют геометрическое сходство с пространственными укладками простых полимеров из леннард-джонсовских частиц на каждом этапе процесса фолдинга.

4. Величина сил, ответственных за формирование вторичной и третичной структуры в белках может существенно различаться.

Апробация работы.

Результаты работы были представлены на 3-й Всероссийской Каргинской конференции «ПОЛИМЕРЫ - 2004» (Москва, 2004 г.), Международной конференции «Ломоносов 2004» (Москва, 2004 г.), 3-й Всероссийской школе-симпозиуме «Динамика и структура в химии и биологии», Москва, 2005, 4-й всероссийской школе-симпозиуме «Динамика и структура в химии и биологии» (Москва, 2006 г.), Международной конференции «Ломоносов 2006» (Москва, 2006 г.), Рабочем совещании по компьютерному моделированию конденсированных фаз, включая биосистемы (Москва, 2006 г.). Доклады о результатах работы были представлены на семинарах кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, включая 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для соискателей ученых степеней.

Личный вклад автора.

Соискатель принимал непосредственное участие в постановке задач, проведении расчетов их обработке и анализе, подготовке статей и докладов на конференциях, а так же в разработке программного обеспечения для проведения, обработки и анализа результатов вычислительных экспериментов.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа (___ страниц) состоит из введения, ___ глав, выводов, списка литературы (___ ссылки) и 2 приложений, иллюстрирована ___ рисунками и содержит ___ таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы задачи работы, кратко охарактеризованы методы их решения, отражены научная новизна и практическая значимость результатов.

В первой главе представлен краткий обзор литературы, посвященный текущему состоянию исследования проблемы фолдинга *in vitro*, в вычислительных экспериментах и существующим моделям и концепциям, относящимся к структуре самоорганизации биополимеров. Также подробно описан метод молекулярной динамики и другие методы молекулярного моделирования.

Во второй главе методами молекулярной динамики исследуются закономерности формирования регулярных пространственных структур в простых модельных полимерах, представляющих собой цепи с относительно жесткими связями и дополнительным леннард-джонсовским (LD) взаимодействием между звеньями.

В качестве начального состояния были взяты вытянутые конфигурации цепей со свободными концевыми участками и циклические структуры, в которых для каждого звена ближайший сосед по цепи и ближайший сосед в пространстве совпадают.

Прежде всего, было исследовано влияние параметров системы на тип конечной структуры. Вычислительные эксперименты показали, что вытянутая цепь может формировать целый ряд упорядоченных структур. Тип конечной структуры зависит от отношения параметра LD-потенциала r_{\min} к равновесной длине b валентной связи. Среди возникающих структур наблюдаются правые и левые спирали, двойные спирали, шпильки, а также структуры, состоящие из свернутых петель. Целый ряд этих структур имеет

геометрическое сходство с элементами вторичной структуры полипептидов и нуклеиновых кислот.

Рассмотрены результаты для цепочки из 100 звеньев при $\epsilon = 10$ ккал/моль. При включенных LD-взаимодействиях между звеньями с индексами i и $i+2$, при значениях $r_{\min} < b$, образуются очень компактные структуры, которые не поддаются определенной классификации. На интервале $b \leq r_{\min} < 2b$ образуются спиральные (точнее, винтовые) структуры, напоминающие α -спирали пептидов. В силу сферической симметрии LD-потенциалов левые и правые спирали образуются с равной вероятностью. Кроме того, могут формироваться структуры, в которых сочетаются и левые, и правые спирали. При значениях $r_{\min} > 2b$ простые спирали становятся менее компактными и менее устойчивыми и могут легко перестроиться в более сложные структуры, такие как двойные спирали в составе шпилек, сходных со шпильками, которые формируются у РНК и ДНК. Здесь же могут формироваться различные структуры другого уровня сложности, где структурной единицей являются петли. Подобные структуры наблюдаются у молекул РНК.

При отключенных LD-взаимодействиях между звеньями с индексами i и $i+2$ (Рис. 1) все конечные структуры схожи с конфигурациями, полученными в первом варианте, однако они формируются при других значениях r_{\min} .

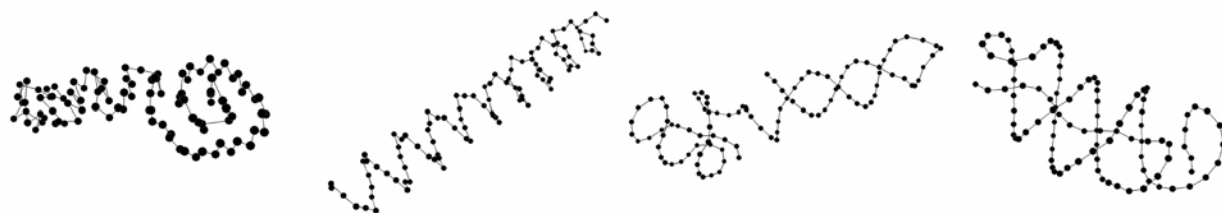


Рис. 1 Типы конечных структур, формирующихся при разных значениях параметра r_{\min} из вытянутой цепочки с выключенными LD-взаимодействиями между звеньями с индексами i и $i+2$. Слева направо: $r_{\min} = 3 \text{ \AA}$, $r_{\min} = 5 \text{ \AA}$, $r_{\min} = 6 \text{ \AA}$, $r_{\min} = 6.5 \text{ \AA}$. Во всех случаях равновесная длина валентной связи $b = 2\text{ \AA}$.

Инициирование структурной самоорганизации происходит на концах линейного полимера, как на наиболее подвижных участках цепи. Показано,

что модуль суммарной силы, действующей на звенья цепи максимален на концевых участках.

По той же причине, в замкнутых цепочках инициирование структурообразования происходит в местах конфигурационных дефектов (резкого изгиба). Были рассмотрены две модели: замкнутая в виде плоского кольца цепь из 200 звеньев, а также замкнутая цепь, лежащая в двух пересекающихся под углом 60° плоскостях.

При отсутствии в начальной конфигурации замкнутой цепи выраженных дефектов упорядоченные структуры формируются в произвольных участках цепи. Изгиб цепи под острым углом в данной модели инициирует образование спиральных структур непосредственно на месте внесенного дефекта.

В линейной цепи с резким изгибом также происходит инициирование структурообразования на месте конфигурационного дефекта.

Серия вычислительных экспериментов для линейных цепей из 100 звеньев с изгибами под углами α от 60° до 165° с шагом 15° показала, что инициирование формирования структуры в середине цепи эффективнее всего происходило при значении $\alpha = 60^\circ$. При дальнейшем увеличении α , вплоть до 180° , специальная роль середины цепи в формировании конечной структуры постепенно уменьшалась.

Таким образом, в рамках данной модели процесс структурной самоорганизации и конечная структура зависят не только от параметров системы, но и от начального состояния.

Также было показано, что при взаимодействии двух цепей формируются спиральные структуры, подобные двойным спиральям ДНК.

В одном варианте начального состояния концевой участок первой цепи сближен с концевым участком другой цепи (Рис. 2 (а)). При такой начальной конфигурации цепи в процессе сворачивания меняют взаимную ориентацию, то есть изначально сближенные концы цепи оказываются на противоположных концевых участках двойной спирали. Одна цепь движется

вдоль другой, в результате чего в системе накапливается внутреннее напряжение, которое может в последствии исказить структуру двойной спирали.

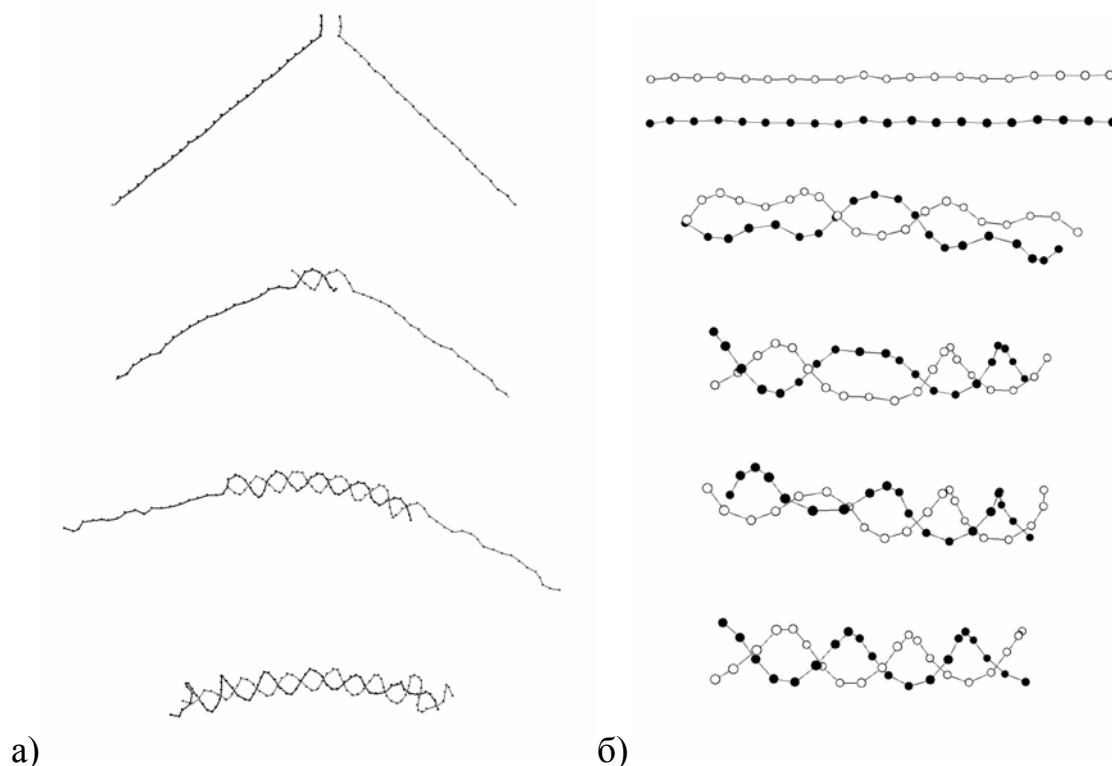


Рис. 2 Процесс формирования в двойной спирали при взаимодействии двух цепочек с различными вариантами начального состояния ситемы:

а) Концевые участки цепей сближены. Сверху вниз: 0 пс, 40 пс, 260 пс, 340 пс.

б) Цепи параллельны. Сверху вниз: 0 пс, 30 пс, 695 пс, 1495 пс, 1495 пс, 1562 пс.

Во втором варианте начальное состояние системы сформировано расположенными параллельно цепями (Рис. 2 (б)). Двуспиральные структуры при указанных параметрах взаимодействия формируются за короткие времена (десятки пс) независимо от длины цепей. В силу сферической симметрии LD-потенциалов полимерные цепи могут формировать структуры, в которых чередуются левые и правые двойные спирали, разделенные короткими неспирализованными участками. Система стремится преобразовать такую структуру в однородную, содержащую либо левую, либо правую двойную спираль. Перестройка структуры происходит за сравнительно длительные времена

Кроме того, была рассмотрена способность простого модельного полимера к рефолдингу при взаимодействии со вспомогательной структурой. В качестве базовой модели системы способствующей быстрой специфической укладке полимерной цепи независимо от начальной конфигурации, была рассмотрена нанотрубка, взаимодействующая с линейным полимером. При определенных параметрах LD-взаимодействия, полимерная цепь, проходя через нанотрубку, разворачивается, а затем формирует новую упорядоченную структуру. Система функционирует только при определенном строении поверхности потенциальной энергии взаимодействия модельной нанотрубки с цепью (Рис 3).

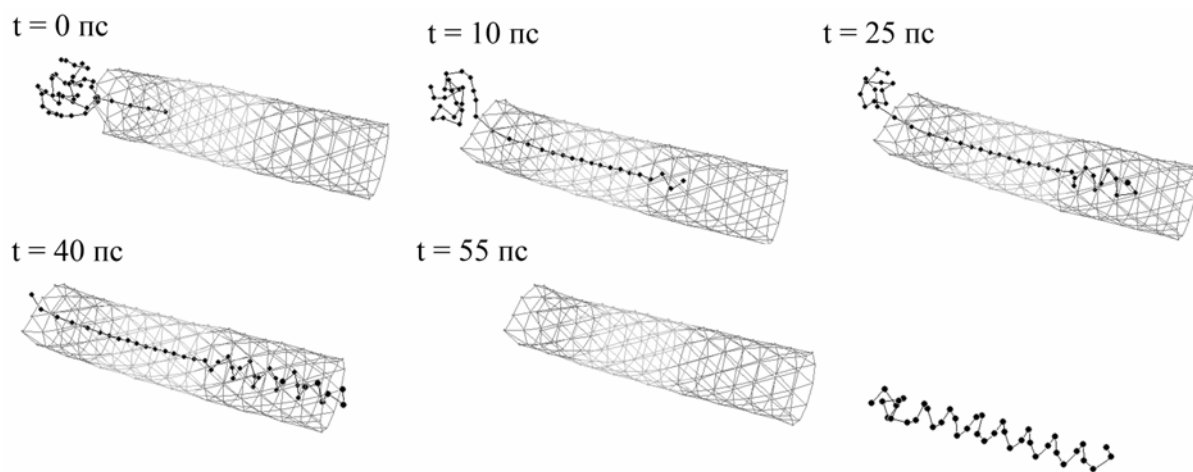


Рис. 3 Процесс рефолдинга полимерной цепочки при взаимодействии с нанотрубкой в разные моменты времени.

Энергетическая поверхность системы формирует «ущелье», которое расширяется ближе к выходу из нанотрубки. Также для выхода полимерной цепи важно, чтобы уровень потенциальной энергии на входе в нанотрубку был выше, чем на выходе. После окончания сборки, взаимодействие между полимерной цепью и нанотрубкой должно быть отключено, то есть данный процесс является энергозависимым.

В результате структурной самоорганизации полимера при отключенном столкновительном термостате формируются плоские структуры, если начальная конфигурация является плоской. Такие структуры, по-видимому, соответствуют седловой точке на энергетической

поверхности полимера. В данной системе, в силу симметрии используемых потенциалов, правые левые спиральные структуры равны по энергии, и они соответствуют локальным минимумам на энергетической гиперповерхности.

Далее, в главе рассмотрены основные факторы, ответственные за формирование модельными полимерами тех или иных структур.

Регулярные пространственные укладки, формируемые цепями из леннард-джонсовских частиц, рассматриваются с помощью элементарных структурных элементов, формируемых четырьмя звеньями. Показано, что если вдоль цепи равновесная длина связи между соседними звеньями и равновесный леннард-джонсовский радиус мономерного звена постоянны, то существует только 6 типов указанных структурных элементов (Рис. 4).

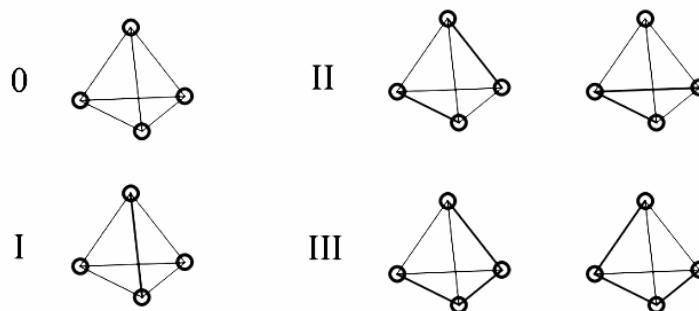


Рис. 4 Шесть типов элементарных тетраэдрических структурных элементов, из которых может быть составлена устойчивая конфигурация линейной неразветвленной цепи. Жирными линиями обозначены связи между соседними звеньями в цепи

Рассмотренный выше процесс структурной самоорганизации при вытянутой начальной конфигурации цепи является поэтапным. Формирование регулярных зародышевых структур начинается с наиболее подвижных участков цепи, и постепенно затрагивает все более обширные области. На начальном этапе структура формируется только на коротких участках полимерной цепи, затем в процесс структурной самоорганизации включаются более дальние взаимодействия.

Описанный последовательный характер структурной самоорганизации принципиально отличается от ситуации, когда в сворачивании полимера участвуют все звенья одновременно. Отрезки цепи разной длины могут формировать различные структуры. Вследствие этого, в процессе

формирования регулярной структуры полимерная цепь претерпевает ряд последовательных перестроек (Рис. 5).

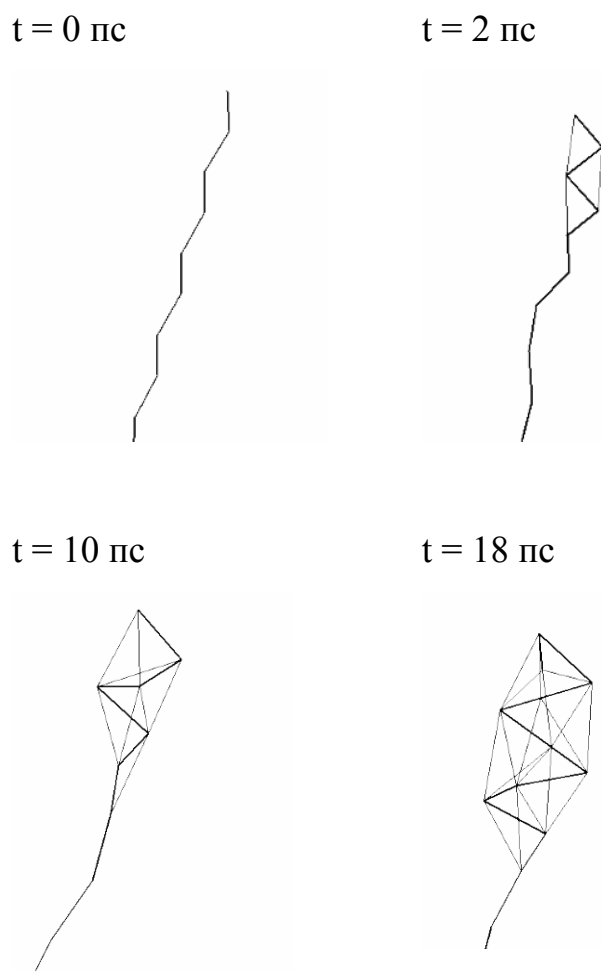


Рис. 5 Последовательные структурные перестройки в процессе сворачивания линейной цепи. Жирными линиями обозначены связи между соседними звеньями цепи, красными – парные расстояния, равные r_{\min} .

Перестройки пространственной конфигурации приводят к формированию характерных для данного сочетания параметров элементарных структур, из которых будет составлена конечная структура.

Путем аналитических расчетов для короткой цепи из пяти звеньев была обоснована связь формируемых ею устойчивых структур со значениями параметров взаимодействия между звеньями. При решении задачи считалось, что в структуре, соответствующей минимальному значению энергии, только одно парное расстояние между звеньями принимает неравновесное значение. Для каждого соотношения параметров r_{\min}/b было рассчитано данное

расстояние, и его значение определяло потенциальную энергию всей системы (вклад каждого равновесного парного расстояния в потенциальную энергию системы считался равным нулю).

В данной задаче достаточно рассмотреть 4 группы структур, в которых неравновесными принимаются расстояния между звеньями с индексами 2 и 4; 1 и 5; 1 и 3 (аналогично случаю, когда неравновесным является расстояние между звеньями 3 и 5); 1 и 4 (аналогично случаю, когда неравновесным является расстояние между звеньями 2 и 5) (Рис. 6).

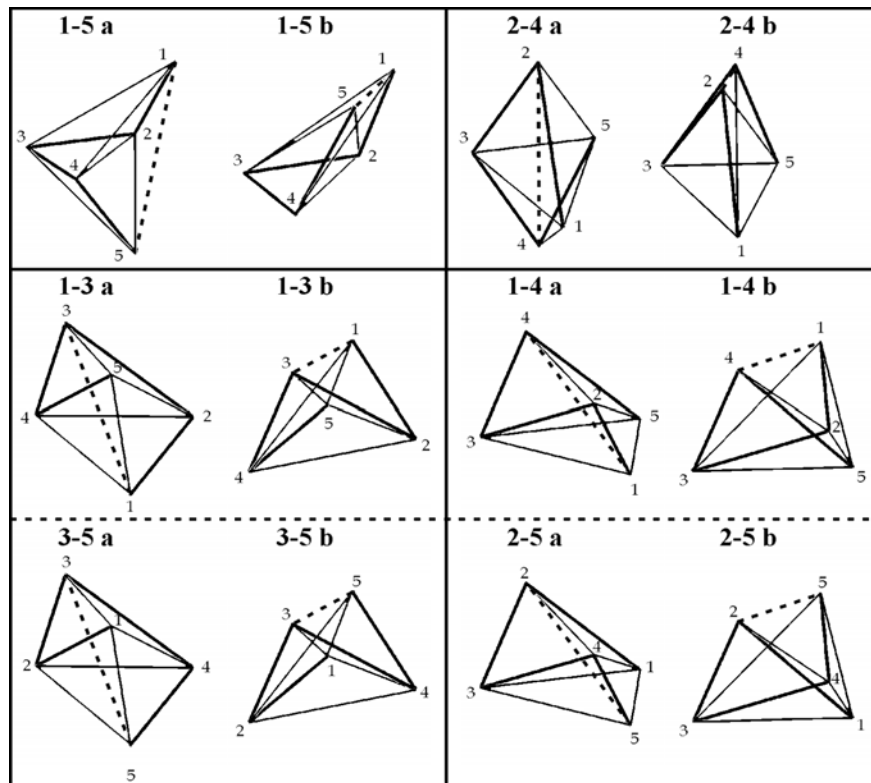


Рис. 6 Способы укладки цепи из пяти звеньев. Жирными линиями обозначены связи между соседними звеньями, равные b , тонкими линиями отмечены парные расстояния, равные r . Черным пунктиром обозначены парные расстояния, принимающие неравновесные значения.

В зависимости от того, какое парное расстояние принимает неравновесное значение, для каждого сочетания параметров r_{\min} и b могут быть получены различные структуры с различными значениями потенциальной энергии. Структура с наименьшим значением энергии будет формироваться с наибольшей вероятностью при данном соотношении параметров r_{\min}/b . Схема решения задачи подробно описана в приложении к диссертации. Результат расчетов в виде графиков функций $U(r/b)$ для всех

случаев представлен на Рис. 7. Из данных графиков была определена наиболее энергетически выгодная структура для каждого набора параметров.

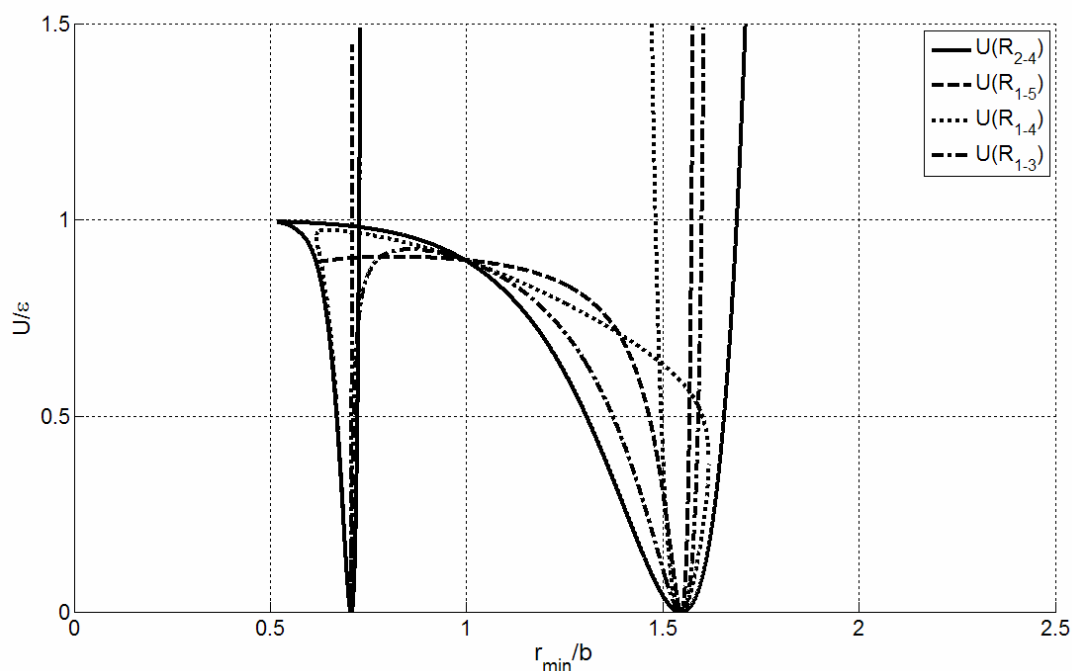


Рис. 7 Графики зависимости значения потенциальной энергии (в единицах ϵ) от соотношения параметров r_{\min}/b для разных пространственных структур, формируемых цепочкой из пяти звеньев.

В работе также описан вычислительный эксперимент по определению устойчивости результата самосборки цепи при флуктуации параметров взаимодействия. Была сконструирована серия полимерных цепей, в вытянутой начальной конфигурации, у которых параметр r_{\min} отличается от значения, соответствующего спиральной конфигурации на случайную величину. Для каждого значения амплитуды флуктуации параметров была рассчитана серия траекторий МД для получения статистически достоверных результатов.

Анализ результатов расчетов показал, что доля спирализованных участков при увеличении амплитуды флуктуации значений параметра уменьшается экспоненциально (Рис. 8). Это свидетельствует о том, что система чувствительна к изменению параметров взаимодействия мономерных звеньев цепи, то есть параметрическая устойчивость системы не наблюдается.

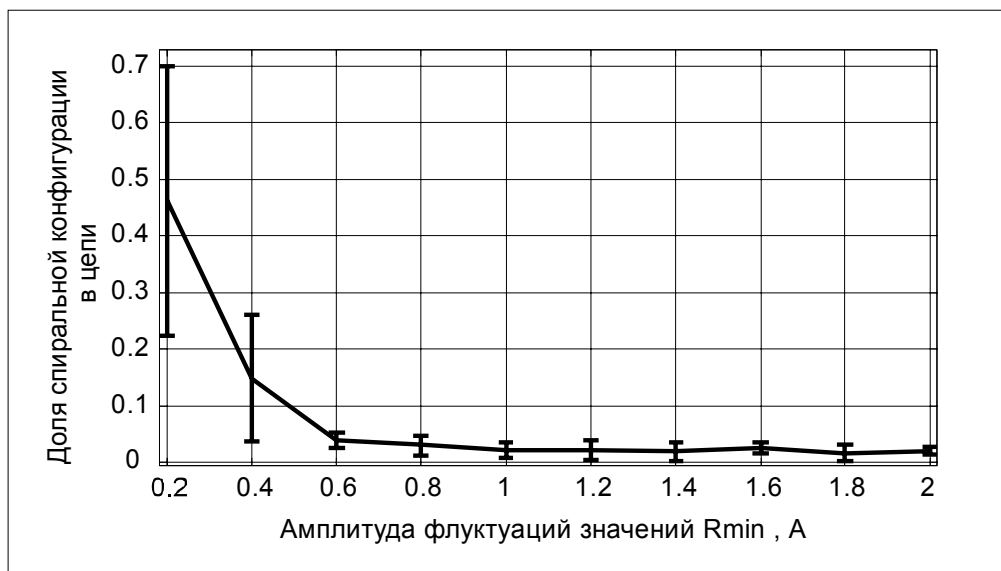


Рис. 8. Зависимость доли спиральной конфигурации в конечной структуре гетерополимерных цепей от амплитуды флуктуации значений параметра r_{min} . Каждая точка графика получена в результате усреднения по ансамблю данных анализа 10 траекторий МД.

Биополимеры, как правило, представляют собой гетерополимеры, то есть они состоят из различных мономеров. Боковые заместители аминокислот, составляющих белки и полипептиды, имеют различные размеры и заряды. Хорошо известно, что отдельные элементы вторичной структуры белков могут быть сформированы аминокислотами с сильно различающимися параметрами. Это свидетельствует об устойчивости данных структурных элементов к флуктуации параметров мономеров, входящих в их состав. Между тем, в третичной структуре биополимеров, как правило, присутствует несколько различных элементов вторичной структуры, определяемых первичной последовательностью мономеров.

Для более корректного воспроизведения структур, формируемых биополимерами, модель требует дальнейшего усложнения, в ней должна присутствовать основная цепь, определяющая способность системы к структурной самоорганизации, и различающиеся по параметрам взаимодействия боковые радикалы, которые определяют конечную гетерогенную структуру биополимера и стабилизируют отдельные структурные элементы.

Изучение модельных полимерных цепей из леннард-джонсовских частиц с боковыми заместителями показало следующее. На выборке из 2000 траекторий при вариации трех параметров взаимодействия наблюдался самопроизвольный переход из вытянутой конфигурации в более компактные варианты укладки цепей. Варьировались следующие параметры:

Равновесная длина связей (b_2) между звеньями основной цепи и боковыми заместителями принимает одно из десяти значений от 0,2 Å до 2 Å с интервалом 0,2 Å.

Параметр r_{\min} взаимодействия Леннард-Джонса между звеньями основной цепи (r_1) принимает одно из десяти значений от 2,1 Å до 3 Å с интервалом 0,1 Å.

Параметр r_{\min} взаимодействия Леннард-Джонса между боковыми заместителями (r_2) принимает одно из двадцати значений от 2,2 Å до 6 Å с интервалом 0,2 Å.

Равновесная длина связей (b_1) между соседними звеньями основной цепи для всех полимерных цепей составляет 2 Å.

Анализ конечных структур показал, что боковые заместители изменяют диапазон параметров взаимодействия, при которых происходит формирование того или иного типа пространственной структуры. Причем, взаимодействие боковых заместителей может приводить к формированию уникальных типов структур, не наблюдаемых у неразветвленных цепей, таких как плоские структуры, схожие с β -структурами белков и полипептидов (Рис. 9)

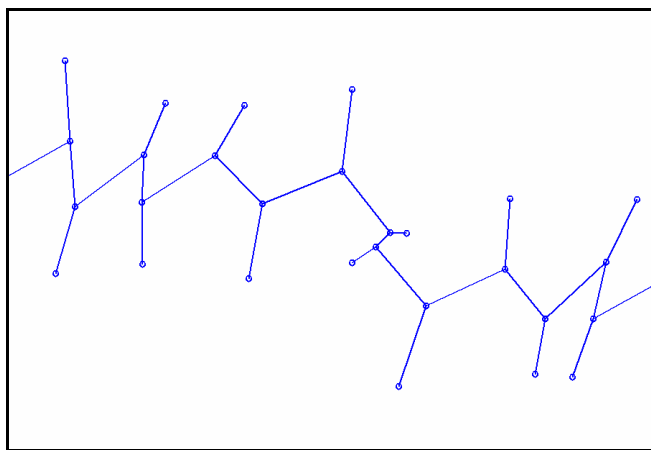


Рис. 9. Фрагмент одной из конечных структур, формируемых полимером с боковыми заместителями. В данной пространственной укладке зарегистрирована большая доля плоских структурных элементов.

В третьей главе описаны результаты численных экспериментов с полноатомными моделями белков и пептидов.

Для оценки устойчивости α -спиралей была проведена серия расчетов молекулярной динамики для следующих олигопептидов: Arg₁₂, Asn₁₂, Asp₁₂, Cys₁₂, Gln₁₂, Glu₁₂, Gly₁₂, Ile₁₂, Leu₁₂, Lys₁₂, Met₁₂, Phe₁₂, Pro₁₂, Ser₁₂, Thr₁₂, Tyr₁₂, Val₁₂. Все указанные пептидные цепочки находились в α -спиральной начальной конформации. Расчет проводился в столкновительной среде при 300К в силовом поле Amber 99. По окончании расчетов был проведен анализ изменения во времени пространственной конфигурации каждого пептида.

Для всех гомопептидов устойчивость α -спиральной конфигурации оказалась различной. В частности, полиаргинин в α -спиральной конфигурации является устойчивым, а α -спиральная конфигурация полиглутаминовой кислоты разрушается в силу электростатического отталкивания боковых радикалов. Полиглицин не формирует устойчивых структур. Формирование наиболее устойчивой α -спиральной конфигурации наблюдалось у полиаланина. Причем, короткие цепи полиаланина способны самопроизвольно переходить из распрямленной конфигурации β -нити в α -спиральную конформацию подобно простым полимерным цепям из леннард-джонсовских частиц. Для цепи из 12 остатков Ala данный процесс завершался в течение примерно 80 пикосекунд (Рис. 10). Конечная

пространственная укладка является устойчивой, при частичном разворачивании α -спираль восстанавливается.

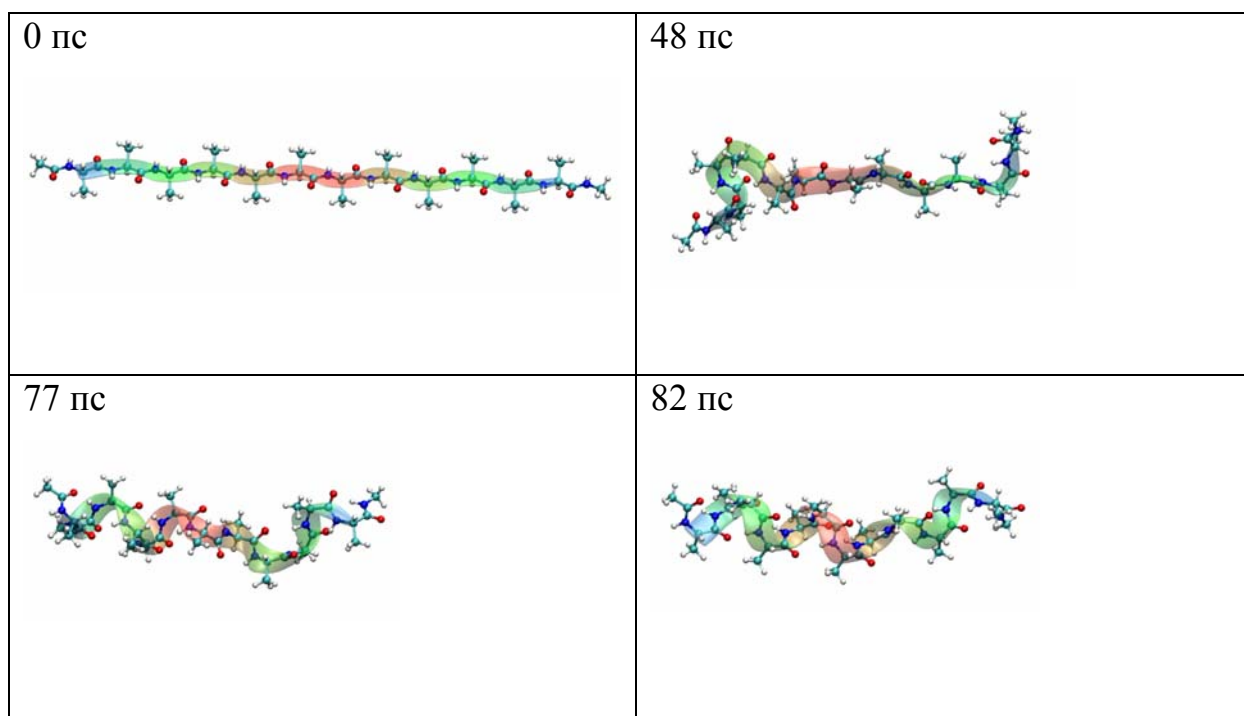


Рис. 10. Различные этапы спонтанного перехода цепи Ala_{12} из β -конформации в α -конформацию.

Анализ матриц парных расстояний между C_α -атомами показывает, что в процессе фолдинга цепь полиаланина претерпевает ту же последовательность структурных перестроек, что и простая полимерная цепочка леннард-джонсовских частиц.

В работе методами неравновесной, или управляемой, молекулярной динамики были также исследованы внутренние силы, ответственные за формирование биополимерами пространственных структур различных уровней путем направленного растяжения цепи.

Изучалась зависимость удлинения α -спирали полипептида Ala_{12} от величины силы, прилагаемой к ее N- и C-концевым участкам в разные стороны. Расчет проводился в столкновительной среде. Зависимость удлинения молекулы от внешней силы дает эффективный коэффициент жесткости молекулы на растяжение вдоль главной оси $k_{\parallel} \approx 143$ пн/Å, что согласуется со значением $k_{\parallel} = 167 \pm 34$ пн/Å, рассчитанным для

додекааланина, исходя из данных, представленных в литературе (Adamovic et al, 2008).

Растяжение белка *de novo*, альбегетина, выполнялось двумя способами. При растяжении с постоянной скоростью был выявлен последовательный характер разрушения исходной пространственной укладки альбегетина: сначала разрушается третичная структура, после этого разворачиваются элементы вторичной структуры, две β - шпильки и две α -спирали. При растяжении α -спиральная конфигурация и β -шпильки переходят, в конечном итоге, в наименее компактную для белков конфигурацию, конфигурацию β -нити.

Растяжение белка при постоянных значениях внешней силы позволило обнаружить существенное различие внутренних сил, ответственных за формирование структурных элементов различных уровней альбегетина. Зависимость удлинения белковой цепи от значений прилагаемой к N- и C-концевым участкам силы является ступенчатой (Рис. 11).

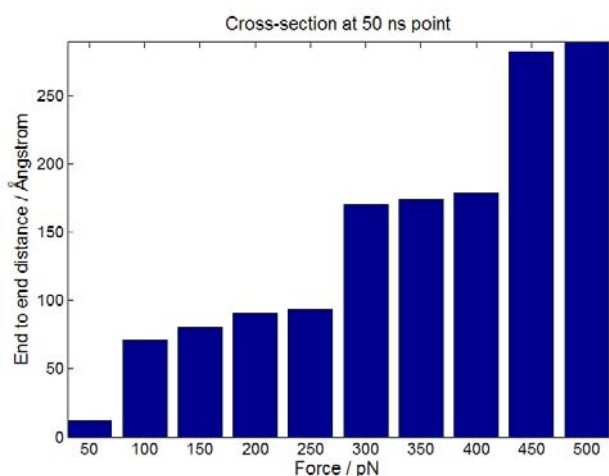


Рис. 11. Зависимость расстояния между N- и C-концевыми участками альбегетина от значений внешней силы.

После полного разворачивания самопроизвольное восстановление нативной структуры (рефолдинг) альбегетина не наблюдалось. Сильное притяжение крупных разноименно заряженных остатков друг к другу приводило к их сближению в пространстве до начала формирования вторичной структуры. Во всех случаях альбегетин переходил в состояние клубка с небольшой долей спирализованных участков цепи.

Заключение

Разработанные методы предоставляют новый подход к изучению процесса фолдинга биополимеров на упрощенной модели, способной к структурной самоорганизации. Представленная модель позволяет наблюдать во времени процесс формирования пространственных структур, схожих с основными элементами вторичной структуры белков и нуклеиновых кислот. На данной модели показано, что формирование таких структурных элементов, как одинарные и двойные спирали, свойственно не только биополимерам, но и более простым линейным полимерам, в том числе, и с боковыми группами. При увеличении отношения параметра LD-потенциала Γ_{\min} к равновесной длине b валентной связи в ряду конечных структур наблюдается переход от более компактных одинарных спиралей, схожих с α -спиралями белков и полипептидов, к двойным спиральям, схожим с двойными спиральями РНК и ДНК. Процесс структурной самоорганизации рассмотренных модельных полимеров протекает последовательно и зависит от начальной конфигурации. На примере комплекса полимера и нанотрубки показано, что и для простейших систем может быть реализован процесс активного фолдинга при условии специфического взаимодействия полимерной цепи со вспомогательными молекулярными структурами.

Введение в модель боковых заместителей позволяет увеличить параметрическую устойчивость конечных структур определенного типа. Кроме того, полимерные цепи с боковыми заместителями способны формировать структуры, которые не наблюдались у неразветвленных полимерных цепей.

На полноатомной модели полиаланина показана возможность протекания фолдинга биополимеров по классической схеме аналогично процессу структурной самоорганизации простых модельных полимеров. Промежуточные структуры, возникающие при переходе полиаланина из β -конфигурации в конформацию α -спирали схожи с промежуточными

структурами, возникающими при структурной самоорганизации простых модельных полимеров.

Зависимость конечного удлинения альбумина от величины внешней силы, направленной на растяжение молекулы, является ступенчатой. Скачкообразное изменение эффективной длины молекулы при увеличении величины прикладываемой к ней силы является признаком существенного различия внутренних сил, ответственных за формирование структурных элементов различных уровней. Подобный ярко выраженный ступенчатый характер зависимости удлинения от величины внешней силы можно ожидать у белков с лабильной третичной структурой таких, как альбумин. В то же время, электростатическое взаимодействие отдаленных (в последовательности) разноименно заряженных аминокислотных остатков альбумина достаточно велико и прерывает процесс последовательного рефолдинга.

Значение эффективного коэффициента жесткости α -спирали додекааланина при растяжении вдоль главной оси, полученное в вычислительном эксперименте управляемой молекулярной динамики, попадает в описанный в литературе диапазон значений. Значения сил, необходимые для разворачивания третичной структуры альбумина также хорошо согласуются с описанными ранее экспериментальными значениями для белков со схожей пространственной структурой. Это дает основание заключить, что применение данного протокола МД приводит к результатам, сопоставимым с экспериментальными данными.

Выводы

1) Структурная самоорганизация рассмотренных модельных биополимерных цепей является последовательным процессом, в результате которого реализуется пространственная структура, состоящая из конечного числа типов элементарных структурных блоков. Время, необходимое для

формирования зародыша регулярной пространственной структуры в условиях численного эксперимента лежит в диапазоне 20 – 100 пс.

2) Отношение параметров взаимодействия между звеньями цепи определяет набор устойчивых структурных элементов. В зависимости от величины соотношения параметров простая полимерная цепь может формировать структуры, имеющие геометрическое сходство с элементами вторичной структуры белков или нуклеиновых кислот.

3) Начальная конфигурация влияет на путь структурообразования модельных биополимеров, определяя конечную пространственную структуру в целом.

4) Поведение относительно простой модельной цепи при сворачивании, а также сходство конечных упорядоченных структур с основными элементами вторичной структуры белков и нуклеиновых кислот свидетельствуют о том, что основную роль в специфическом сворачивании биомакромолекул играют общие для различных классов биополимеров динамические свойства, определяемые грубым рельефом энергетической поверхности.

5) Введение боковых заместителей может приводить к формированию уникальных типов структур, не наблюдаемых у неразветвленных цепей. Однако в большинстве случаев боковые заместители вносят в процесс структурной самоорганизации менее критичные возмущения в виде изменения диапазона параметров взаимодействия, при которых происходит формирование того или иного типа пространственной структуры.

6) На примере полноатомной модели пептида Ala₁₂, продемонстрировано, что фолдинг биополимеров может происходить по схеме, описанной для модельной структуры.

7) Ступенчатый характер разворачивания белка при растяжении является следствием существенного различия величины сил, ответственных за разворачивание структурных элементов различных уровней.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шайтан К. В., Турлей Е. В., Голик Д. Н., Терёшкина К. Б., Левцова О. В., Федик И. В., Шайтан А. К., Ли А., Кирпичников М. П. Динамический молекулярный дизайн био- и наноструктур // Российский химический журнал – 2006 - Т. 1 (№ 2). – С. 53-65.

2. Шайтан К. В., Турлей Е. В., Голик Д. Н., Терёшкина К. Б., Левцова О. В., Федик И. В., Шайтан А. К., Кирпичников М. П. Молекулярная динамика и дизайн био- и наноструктур // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии - 2005b. - Т. 1 (Вып. 1). - С. 66-78.

3. Шайтан К. В., Турлей Е. В., Голик Д. Н., Терёшкина К. Б., Левцова О. В., Федик И. В., Шайтан А. К., Кирпичников М. П. Неравновесная молекулярная динамика био- и наноструктур // Химическая физика - 2006b. - Т. 25 (Вып. 9). - С. 31-48.

4. Федик И. В., Шайтан К. В. Рефолдинг модельного полимера при взаимодействии с нанотрубкой // Биофизика – 2008 – Т. 53 (Вып. 1). – С. 61-65.

5. И.В. Федик, К.В.Шайтан - Влияние силового поля и начальных параметров на динамику фолдинга // Сборник тезисов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2004". М.: МГУ. – 2004.

6. И.В. Федик – Управляемая молекулярная динамика разворачивания и рефолдинга белковых структур // Сборник тезисов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2006". М.: МГУ. – 2006.