

На правах рукописи

Глякина Анна Владимировна

**ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ НА
ИХ МЕХАНИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ**

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории молекулярной динамики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института математических проблем биологии Российской академии наук

Научные руководители: кандидат физико-математических наук,
доцент

Балабаев Николай Кириллович

доктор физико-математических наук
Галзитская Оксана Валериановна

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор кафедры биоинженерии
биологического факультета МГУ имени
М.В. Ломоносова

Шайтан Константин Вольдемарович

доктор биологических наук, ведущий
научный сотрудник лаборатории
молекулярной физиологии клетки ФГБУН
Института биофизики клетки РАН

Сивожелезов Виктор Семенович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт химической
физики им. Н.Н. Семенова Российской
академии наук

Защита состоится «13» июня 2013 г. в 14 час. 00 мин. на заседании
Диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном
университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва,
Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория 389.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского
государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан:

“ ___ ” _____ 2013 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук



М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Трехмерная структура белка определяется балансом разных взаимодействий. Водородные связи, солевые мостики, гидрофобный эффект – все играет важную роль в сворачивании белка и приобретении им конечной нативной структуры. Физические свойства белков прямо связаны с их функциональной активностью и реакцией на внешние воздействия в различных биологических процессах. Они определяют структурную устойчивость и термостабильность макромолекул. Большое значение имеют зависимости механических свойств белков от температуры, степени их гидратации и свойств растворителя. Исследование физических характеристик белков является важной и актуальной задачей.

Механические свойства белков являются важными для широкого круга биологических процессов, таких как межклеточная адгезия, сокращение мышц, транслокация белков через мембрану. Понимание того, как природные белки достигают требуемой механической стабильности необходимо не только для понимания процессов происходящих в природе, но и для конструирования новых, основанных на этих данных, биоматериалов для медицинского и промышленного применения. А для этого необходимо знать то, как поведет себя тот или иной белок при различных способах воздействия на него.

Разворачивание отдельных белков растяжением их за концы стало возможным благодаря развитию атомно-силовой микроскопии. В конце 1986 года Г. Биннингом был разработан атомно-силовой микроскоп, открывший новые перспективы в изучении процесса сворачивания белков. Эксперименты по разворачиванию белков с помощью атомно-силового микроскопа обычно проводятся на многодоменных белках, либо для цепочки «сшитых» одинаковых или разных белков.

Компьютерные методы моделирования молекулярной динамики позволяют на атомном уровне исследовать процессы механического

разворачивания глобулярных белков. В этих экспериментах получают профиль зависимости силы от величины растяжения.

Экспериментально, при помощи атомно-силовой микроскопии при растяжении белков было обнаружено, что β -структурные белки выдерживают существенно большие нагрузки, чем α -спиральные или α/β структурные белки. Считается, что упаковка элементов вторичной структуры белка является критическим фактором в определении его механической стабильности и термостабильности. Так, несколько водородных связей между соседними β -участками в β -листе стабилизируют структуру значительно сильнее, чем такое же количество гидрофобных контактов между спиральями в α -спиральных белках. Однако не существует простого соотношения между структурой белка и его механической стабильностью и термостабильностью. Даже небольшие изменения в аминокислотной последовательности могут существенно повлиять на механические свойства белка и термостабильность. Направление приложения силы также является критическим фактором в определении механической стабильности. Детальное исследование путей силового разворачивания белка необходимо для понимания молекулярной природы механической стабильности белков.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы было исследование путей механического разворачивания белков при приложении к их концам дополнительной внешней силы, а также поиск структурных факторов, ответственных за термостабильность белков из термофильных организмов.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести моделирование методом молекулярной динамики с использованием явной модели растворителя процесс силового разворачивания похожих по структуре, но различающихся по аминокислотной последовательности иммуноглобулинсвязывающих доменов белков L и G (эти белки являются хорошими модельными объектами и достаточно широко изучены экспериментально различными методами).

2. Выявить зависимость характеристик механического разворачивания белков от величины силы и скорости растяжения.

3. Установить пути и характер разворачивания белков под действием приложенных к его концам сил.

4. На примере белка L изучить влияние точечных аминокислотных замен на его механические свойства.

5. Выявить сходства и различия, похожих по структуре белков из термофильных и мезофильных организмов.

Научная новизна работы. Впервые, с использованием метода молекулярной динамики, было показано, что процесс механического разворачивания небольших белков L и G (63 и 56 аминокислотных остатков) проходит не по простому одностадийному механизму, а через короткоживущие промежуточные состояния. В дальнейшем данное предположение было подтверждено экспериментально. Показано, что белки из термофильных организмов содержат больше межатомных контактов на остаток по сравнению со своими гомологами из мезофильных организмов. Вклад в увеличение числа контактов дают внешние аминокислотные остатки, доступные растворителю.

Практическая значимость работы. Полученные результаты представляют интерес для понимания молекулярной природы механической стабильности и термостабильности белков.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях: 11-я, 12-я, 13-я, 14-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, Россия, 2007, 2008, 2009, 2010); II, III Международная конференция «Математическая биология и биоинформатика» (Пущино, Россия, 2008, 2010); IV Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Казань, Россия, 2009); V Санкт-Петербургская конференция молодых учёных «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, Россия, 2009); VII

Национальная конференция «Рентгеновское, Синхротронное излучения, Нейтроны и Электроны для исследования наносистем и материалов. Нано-Био-Инфо-Когнитивные технологии РСНЭ-НБИК 2009» (Москва, Россия, 2009); XV Симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул (Петрозаводск, Россия, 2010); V Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры-2010» (Москва, Россия, 2010); конференция молодых ученых «Современные проблемы теоретической физики» (Киев, Украина, 2010); XVIII Международная Конференция «Математика. Компьютер. Образование» (Пушино, Россия, 2011); XIX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» (Москва, Россия, 2012); IV Съезд биофизиков России (Нижний Новгород, Россия, 2012).

Публикации. Основные результаты диссертации представлены в 24 печатных работах, в том числе в 10 статьях в реферируемых научных изданиях.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 103 страницах машинописного текста и состоит из введения, 6 глав (обзора литературы, изложения метода молекулярной динамики, обсуждения полученных результатов), благодарностей, выводов, и списка цитируемой литературы, включающего 109 ссылок. Работу иллюстрируют 26 рисунков и 12 таблиц.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и основные задачи исследования, обозначены научная новизна и практическая значимость работы.

В **первой главе** работы дан обзор литературы, в которые представлены данные об экспериментальных и теоретических работах, посвященных исследованию различных свойств белков.

Во **второй главе** дается описание метода молекулярной динамики, алгоритмов поддержания в системе постоянных температуры и давления, алгоритма вычисления взаимодействий между частицами, которые не связаны валентно, алгоритма численного интегрирования уравнений движения.

Третья глава посвящена описанию объектов исследования, а также описанию постановки и проведения молекулярно-динамических экспериментов.

Четвертая глава посвящена исследованию механического разворачивания нативных белков L и G. Методом молекулярной динамики с использованием явной модели растворителя исследовались процессы механического разворачивания белков под действием приложенной внешней силы. С белками проводилось два типа вычислительных экспериментов: в одном случае к концам белка прикладывалась постоянная внешняя сила (разворачивание постоянной силой); в другом случае, концы белков равномерно удалялись относительно друг друга в противоположенные стороны (разворачивание постоянной скоростью).

В качестве объектов исследования были взяты два иммуноглобулинсвязывающих домена белков L и G (далее для краткости – белок L и белок G соответственно). Белок L (название файла в базе белковых структур – 2ptl) состоит из 63 аминокислотных остатков (остатки с 16-го по 78-й по последовательности) и содержит 951 атом. Белок G (название файла в базе белковых структур – 1rgb) содержит 56 аминокислотных остатков (853 атома). Оба этих белка состоят из двух β -шпилек, расположенных на концах белка (N- и C-шпильки), и α -спирали между ними. Белки имеют одинаковые пространственные структуры (среднеквадратичное отклонение выравненных C α -атомов этих белков составляет 1.38 Å), но различные аминокислотные последовательности (рис. 1).

Таблица 1. Перечень проведенных вычислительных экспериментов.

Нативные иммуноглобулинсвязывающие домены белков L и G		
Число траекторий		
F=const, T=350 K		
F, пН	Белок L	Белок G
600	10	10
700	10	10
800	10	10
900	10	10
1000	10	10
T=const, F=1050 пН		
T, K	Белок L	Белок G
320	5	5
350	10	10
400	5	5
v=const, T=350 K		
v, Å/пс	Белок L	Белок G
0.0050	4	4
0.0625	10	10
0.1250	10	10
Белок L с аминокислотными заменами		
(49 одиночных замен на аланин и замена всех аминокислотных остатков на аланин кроме глицинов)		
v=0.05 Å/пс, T=350 K		
150		
(по 3 независимых вычислительных эксперимента при каждой аминокислотной замене)		

При растяжении белков за концы с постоянной скоростью следили за зависимостью сил реакции, действующих на концевые атомы белка и обеспечивающих изменение расстояния между ними с заданной скоростью. Эти силы усреднялись по небольшому промежутку времени (в данном случае по 5 пс) и по значениям для двух концов.

Графики зависимости силы от расстояния между концами белков приведены на рис. 2. Исследование этих зависимостей показало, что все полученные траектории можно поделить на три группы: траектории, на которых появляется один (в 6 случаях для белка L и в 8 для белка G), два (в 12 случаях для белка L и в 13 случаях для белка G) и три (в 6 случаях для белка L и в 3 случаях для белка G) пика силы. Причем два пика силы как для белка L, так и для белка G наблюдаются в половине случаев не зависимо от величины скорости растяжения. Наличие нескольких пиков силы на

траектории говорит о том, что в процессе такого механического разворачивания этих белков появляются промежуточные состояния.

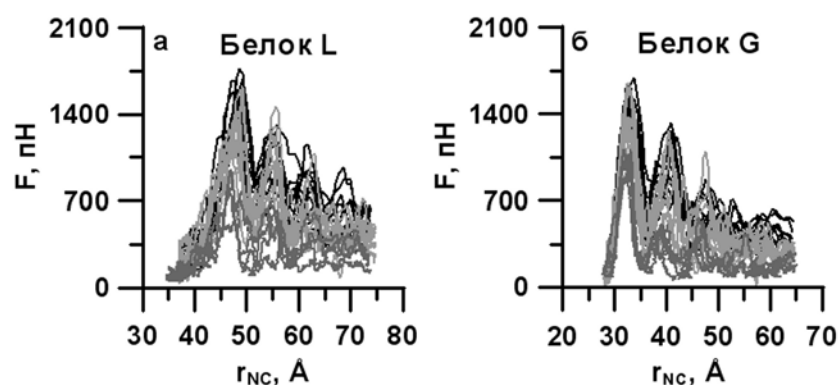


Рис. 2. Зависимость силы реакции F , действующей на концы белка, от расстояния между концами белка r_{NC} при различных скоростях растяжения ($v=0.1250 \text{ \AA/пс}$ – черные кривые, 0.0625 \AA/пс – светло-серые кривые, 0.0050 \AA/пс – серые кривые): а) белок L; б) белок G. Для скоростей 0.1250 и 0.0625 \AA/пс представлено по 10 траекторий для каждого белка, а для скорости 0.0050 \AA/пс – по 4 траектории.

Экспериментальные работы по растяжению этих белков в атомно-силовой микроскопии и теоретические работы, в которых используются грубые модели белков либо же растворитель учитывается неявно, указывают на то, что эти белки сворачиваются/разворачиваются по простому одностадийному механизму [Brockwell et al., 2005, *Biophys. J.*, 89, 506; Cao and Li, 2007, *Nat. Mater.*, 6, 109; Cao and Li, 2008, *J. Mol. Biol.*, 375, 316]. В опубликованных недавно экспериментальных работах [Waldauer et al., 2008, *HFSP J.*, 2, 388; Morrone et al., 2011, *Biophys. J.*, 101, 2053] по разворачиванию белков L и G под воздействием денатуранта было показано, что этот процесс не описывается простой двухстадийной моделью разворачивания.

Наличие нескольких пиков силы на траектории не зависит от величины скорости растяжения. При каждой из использованных в данной работе скоростей растяжения есть траектории, на которых появляются как один, так и два, и три пика силы. От величины скорости растяжения зависит только высота пика силы, и естественно, что чем больше величина скорости растяжения, тем выше пик силы. Это объясняется тем, что при более высокой

скорости растяжения не все возникающие напряжения успевают релаксировать, и происходит их наложение, что в свою очередь приводит к увеличению высоты пиков.

На рис. 3а приведен график зависимости средней максимальной силы F_{\max} , которая возникает при таком механическом разворачивании белков, от величины скорости растяжения. Из этого графика видно, что при двух самых высоких скоростях оба белка характеризуются близкими значениями величины силы F_{\max} . Различия становятся заметны только для наименьшей из использованных скоростей растяжения. Для того чтобы развернуть белок G потребовалась большая сила, чем та, которая возникает при растяжении белка L. Из этого следует, что белок G – более механически стабилен, чем белок L. Это утверждение согласуется с экспериментальными данными из которых следует, что для разворачивания белка L надо приложить силу не менее 136 пН, а для белка G – 180 пН [Brockwell et al., 2005, *Biophys. J.*, 89, 506; Cao and Li, 2007, *Nat. Mater.*, 6, 109].

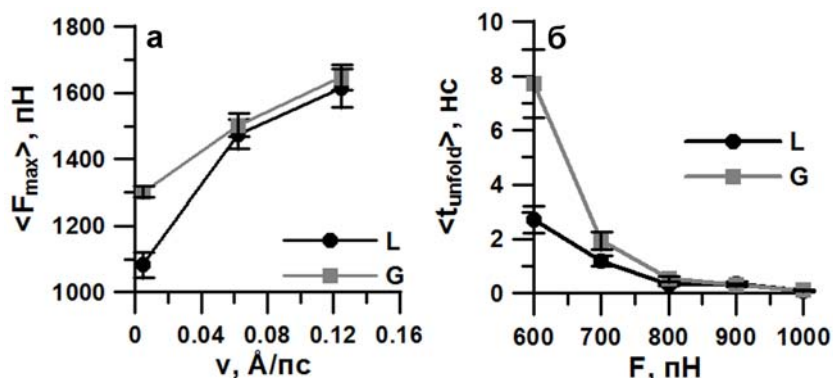


Рис. 3. Зависимости а) средней максимальной силы F_{\max} , возникающей при растяжении белков с постоянной скоростью; б) среднего времени начала разворачивания белков от величины силы растяжения.

В экспериментах при растяжении белков за концы с постоянной силой, следили за тем, как меняется расстояние между концами белка с течением времени. На рис. 4 приведены полученные зависимости для белков L и G и наборов независимых траекторий их разворачивания при различных величинах сил растяжения. Из этого рисунка видно, что при общей

похожести этих кривых разброс времен разворачивания для белка G значительно шире, чем у белка L. Из этого следует, что белки L и G по-разному реагируют на прикладываемую к ним нагрузку.

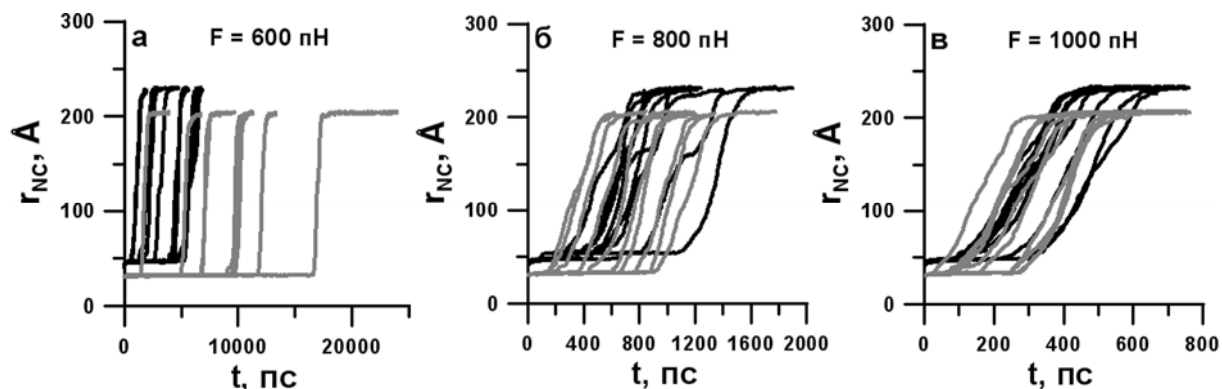


Рис. 4. Изменение расстояния Γ_{NC} между концами белка от времени при заданной силе растяжения: а) 600 пН; б) 800 пН; в) 1000 пН. Черные кривые относятся к белку L, серые – к белку G. Разные кривые одного и того же типа относятся к различным (независимым) траекториям белка. Для каждой силы растяжения представлено по 10 траекторий для каждого белка.

На рис. 3б приведены зависимости среднего времени начала разворачивания белков L и G от величины силы растяжения. Этим временем считалось время, при котором расстояние между N- и C-концами белков начинает резко возрастать. Из рис. 3б видно, что при силе растяжения $F=600$ пН для разворачивания белка G требуется порядка 8 нс, а для белка L – 3 нс. А из этого следует то, что белок G является более механически стабильным по сравнению с белком L в диапазоне малых сил растяжения (600 и 700 пН).

В таблице 2 приведены значения средних времен начала разворачивания белков L и G при силе растяжения $F=1050$ пН при температурах $T=320, 350$ и 400 К. Как и следовало ожидать, с повышением температуры время разворачивания для обоих белков уменьшается. Из таблицы 2 видно, что белок L разворачивается примерно в 1.5 раза быстрее по сравнению с белком G. Из этого опять же следует то, что белок G с повышением температуры остается более механически стабильным по сравнению с белком L.

Таблица 2. Среднее время начала разворачивания белков L и G при силе растяжения $F=1050$ пН.

Температура, К	320	350	400
Белок L, время (пс)	224±36 (5 траекторий)	86±12 (10 траекторий)	71±22 (5 траекторий)
Белок G, время (пс)	558±261 (5 траекторий)	115±24 (10 траекторий)	106±27 (5 траекторий)

Анализ изменения числа контактов между различными элементами вторичной структуры при механическом растяжении белков позволил выявить три возможных способа разворачивания белков L и G. Во всех случаях белки сначала распадаются на две структурные единицы. В первом случае этими структурными единицами являются [N-шпилька + α -спираль] и [C-шпилька]. В этом случае первой разворачивается C-концевая β -шпилька, за ней α -спираль, и последней – N-концевая β -шпилька. Во втором случае этими структурными единицами являются [N-шпилька] и [C-шпилька], а α -спираль не примыкает ни к одному из этих блоков. В данном случае первой разворачивается α -спираль, за ней C-концевая β -шпилька, и последней – N-концевая β -шпилька. И в третьем случае этими структурными единицами являются [N-шпилька] и [α -спираль + C-шпилька]. В этом случае первой разворачивается N-концевая β -шпилька, а за ней α -спираль и C-концевая β -шпилька. Причем первый способ наблюдается наиболее часто (в 50 и 48 случаях из 74 для белков L и G соответственно), а третий способ наблюдался редко (как для белка L (в 7 случаях), так и для белка G (всего лишь в 2 случаях)) только при самых маленьких скоростях и силах растяжения.

Таким образом, было обнаружено, что при больших силах ($F > 800$ пН) и скоростях растяжения ($v > 0.0625$ Å/пс) средние времена и средние максимальные силы, которые требуются для разворачивания белков L и G близки. С уменьшением силы и скорости растяжения для разворачивания белка G в среднем требуется большее время и большая сила, чем для белка L. А это говорит о том, что белок G – более механически стабилен по

сравнению с белком L в диапазоне малых скоростей и сил растяжения. Но в тоже время величина прикладываемой силы не изменяет пути механического разворачивания белков L и G.

Данное исследование показало, что и в белке L и в белке G самым механически стабильным элементом вторичной структуры является N-концевая β -шпилька. В экспериментах по разворачиванию этих двух белков под воздействием денатуранта было показано, что в ядро сворачивания белка L входит N-концевая β -шпилька [Kim et al., 2000, *J. Mol. Biol.*, 298, 971], а белка G – C-концевая β -шпилька [McCallister et al., 2000, *Nat. Struct. Biol.*, 7, 669]. Таким образом, экспериментальные данные по разворачиванию этих белков под воздействием денатуранта, и теоретические данные по моделированию разворачивания этих белков под действием силы совпадают для белка L, а для белка G – нет. Экспериментально было показано, что пути механического и температурного разворачивания, либо разворачивания денатурантом не всегда совпадают.

Пятая глава работы посвящена изучению механического разворачивания белка L с точечными аминокислотными заменами. Для этого помимо нативной структуры белка L, были также получены 49 новых структур, отличающихся от нативной заменой одного из аминокислотных остатков на аланин. Затем моделировался процесс разворачивания полученных структур белков путем растяжения их за концы с постоянной скоростью ($v=0.05 \text{ \AA/пс}$, $T=350 \text{ K}$). Для каждой аминокислотной замены было проведено по три независимых вычислительных эксперимента с различными начальными данными.

Анализ механического разворачивания белка L с точечными аминокислотными заменами показал, что есть замены, которые как понижают (в 6 случаях) максимальную силу реакции F, действующей на концы белка (пик силы), так и повышают ее (в 4 случаях). Все 6 замен, понижающих пик силы, располагаются во вторичной структуре белка. А из 4 замен, которые повышают пик силы, 3 располагаются во вторичной

структуре, и 1 в петле. Остальные 39 аминокислотных замен никак не повлияли на эту характеристику.

Так же была вычислена работа внешней силы по первичному разрушению структуры белка. Эта работа вычислялась как площадь под кривой зависимости силы реакции, действующей на концы белка, от расстояния между концами белка. Было показано, что эта работа в 19 случаях в среднем понижалась на 13%, по сравнению с нативной структурой. В остальных 30 случаях она не отличалась от работы, которую надо затратить на первичное разрушение нативного белка L. Из 19 замен, приводящих к понижению механической стабильности белка, 11 располагалось во вторичной структуре, а 8 в петлях. Полученный результат может служить указанием на то, что механическая стабильность белковой глобулы определяется не только мотивом и компактностью укладки вторичных структур белка, но и особенностями и составом аминокислот в соединяющих их нерегулярных участках (петлях) полипептидной цепи.

Средняя максимальная сила разворачивания для нативного белка L составляет 1312 ± 87 пН ($v=0.05$ Å/пс, $T=350$ К). Для белка, в котором все аминокислотные остатки, кроме глицинов, заменены на аланины, становится равной 956 ± 47 пН, т.е. в среднем понижается на 300 пН. Но при этом характер механического разворачивания такого белка не отличается от нативного. Этот белок разворачивается по наиболее вероятному пути, который характерен для нативного белка: первой разворачивается C-концевая β -шпилька, за ней α -спираль, и последней – N-концевая β -шпилька. При этом на кривой зависимости силы от расстояния между концами белка наблюдаются два пика силы, что говорит о появлении короткоживущих промежуточных состояний. Таким образом, механическая стабильность белков определяется взаимодействиями между аминокислотными остатками, а путь разворачивания зависит от топологии белка.

Известно, что белок G более термодинамически стабилен по сравнению с белком L (белок G разворачивается при 89°C [Stone M.J. et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 185], а белок L – при 75°C [Gillespie B. et al., 2000, *PNAS*, 97, 12014]). И это может объясняться тем, что у белка G большее число межатомных контактов для внешних аминокислотных остатков, чем для белка L. Такая же картина наблюдается для белков из термофильных организмов, по сравнению с белками из мезофильных организмов. Анализ структурных различий между белками из термофильных и мезофильных организмов рассматривался в следующей главе.

Шестая глава работы посвящена изучению структурных факторов, ответственных за стабильность белков из термофильных организмов. Для этого была построена база, которая включала в себя 373 пары пространственно выравненных структур белков из термофильных и мезофильных организмов (http://bioinfo.protres.ru/resources/termo_meso_base.html). Термофилы – организмы, живущие при высоких температурах (50–80°C), мезофилы – организмы, живущие при нормальной температуре. В дальнейшем в тексте для краткости белки из термофильных организмов были названы просто термофилами, а из мезофильных – мезофилами. Исследуемая база белков была отобрана по следующим критериям: многодоменные белки были разделены на домены; длина доменов не превышала 400 аминокислотных остатков; разница длин белков в паре не превышала 10% от длины белка меньшего размера; домены, состоящие из двух или более отдаленных участков цепи, были исключены.

Таблица 3. Среднее число межатомных контактов на остаток для всех, внутренних и внешних аминокислотных остатков для 373 пар белков из термофильных и мезофильных организмов.

Типы остатков	Доля, %	Контактное расстояние 6 Å		Контактное расстояние 8 Å	
		термофилы	мезофилы	термофилы	мезофилы
Все	100	82.1±0.4	80.7±0.4	219.0±1.1	215.1±1.1
Внутренние	13	108.6±1.0	109.2±0.9	289.5±2.8	290.6±2.5
Внешние	46	61.0±0.2	59.5±0.2	163.6±0.6	159.4±0.6

Для данной базы доля аминокислотных остатков, вовлеченных в различные типы вторичной структуры, в термофильных и мезофильных белках одинакова и равна 80%. Из литературных данных известно, что термофильные белки более компактны [Robinson-Rechavi et al., 2006, *J. Mol. Biol.*, 356, 547]. Это может быть следствием увеличения числа контактов между аминокислотными остатками у термофилов по сравнению с мезофилами. Чтобы проверить это утверждение, было подсчитано число межатомных контактов на остаток для 373 пар белков термофил-мезофил при контактных расстояниях 6 и 8 Å (считалось, что два атома находятся в контакте друг с другом, если расстояние между ними менее 6 Å (8 Å), межатомные контакты между соседними по цепи остатками в расчет не принимались). В термофильных белках наблюдается повышенное число межатомных контактов на остаток по сравнению с мезофильными (разница 1.4 ± 0.4 для 6 Å и 3.9 ± 1.1 для 8 Å, таблица 3). Чтобы определить за счёт каких аминокислотных остатков наблюдается такое повышение, в каждом белке аминокислотные остатки были разделены на промежуточные, внутренние и внешние. Остаток считался внутренним, если площадь его доступной для растворителя поверхности равнялась нулю; а внешним – если соответствующая площадь была больше 25% от максимальной площади поверхности остатка, доступной растворителю. Остальные аминокислотные остатки считались промежуточными [Fukuchi and Nishikawa, 2001, *J. Mol. Biol.*, 309, 835]. Оказалось, что термофильные и мезофильные белки не отличаются по доли в них внутренних, внешних и промежуточных аминокислотных остатков: 13, 46 и 41%, соответственно. Было подсчитано число межатомных контактов на остаток для внутренних и внешних аминокислотных остатков термофильных и мезофильных белков (таблица 3). Внутренние аминокислотные остатки термофильных и мезофильных белков не отличаются по числу межатомных контактов на остаток. Это свидетельствует о том, что внутренние части термофильных и мезофильных белков одинаково плотно упакованы, а внешние аминокислотные остатки

термофильных белков имеют повышенное число межатомных контактов на остаток по сравнению с мезофильными (разница 1.5 ± 0.2 для 6 \AA и 4.1 ± 0.6 для 8 \AA).

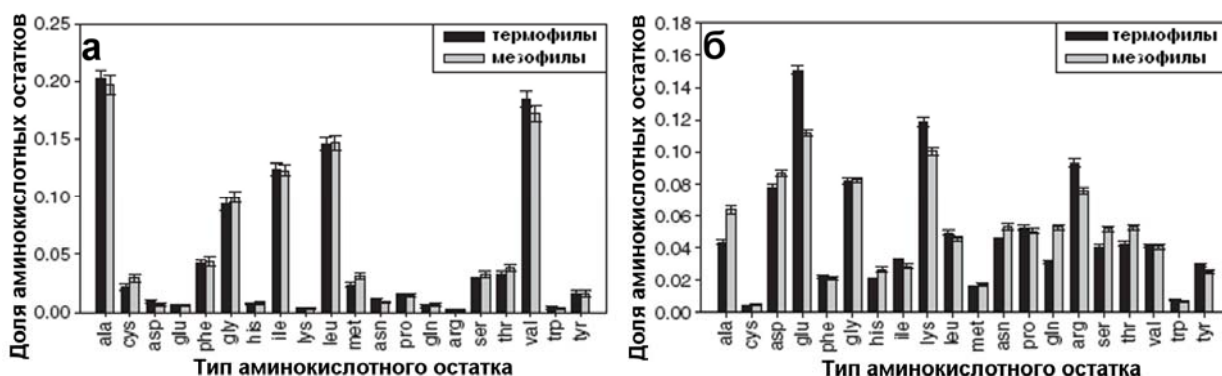


Рис. 5. Доля каждого типа аминокислотных остатков, входящих в состав 373 пары термофильных и мезофильных белков: а) внутренние аминокислотные остатки; б) внешние аминокислотные остатки.

Также был проанализирован аминокислотный состав внутренних и внешних остатков термофильных и мезофильных белков. Из рис. 5а видно, что внутренние остатки термофильных и мезофильных белков в среднем не отличаются по своему аминокислотному составу. Среди внешних остатков термофильных белков наблюдается повышенное содержание по сравнению с мезофильными гомологами таких аминокислот, как лизин (разница 0.019 ± 0.003), аргинин (0.017 ± 0.003) и глутаминовая кислота (0.039 ± 0.003). И, наоборот, среди внешних остатков мезофильных белков наблюдается повышенное содержание по сравнению с термофильными гомологами аланина (0.020 ± 0.002), аспарагиновой кислоты (0.009 ± 0.002), аспарагина (0.008 ± 0.002), глутамин (0.022 ± 0.002), треонина (0.011 ± 0.002), серина (0.012 ± 0.002) и гистидина (0.007 ± 0.001) (рис. 5б).

ВЫВОДЫ

1. Показано, что белок G более механически стабилен по сравнению с белком L, так как для его разворачивания требуется большее время и большая сила. Но с ростом величины приложенной силы\скорости растяжения это различие исчезает.

2. Показано, что на пути механического разворачивания белков L и G появляются короткоживущие промежуточные состояния.

3. Установлено наличие трех путей разворачивания белков L и G. Во всех случаях нативные структуры белков сначала распадаются на две структурные единицы. В первом случае этими структурными единицами являются [N-шпилька + α -спираль] и [C-шпилька], во втором – [N-шпилька] и [C-шпилька] (α -спираль не примыкает ни к одному из этих блоков) и в третьем – [N-шпилька] и [α -спираль + C-шпилька]. В первом случае сначала разрушается C-концевая β -шпилька, во-втором – α -спираль, а в третьем – N-концевая β -шпилька. Первый из сценариев разворачивания имеет большую вероятность (он встречается в 50 и 48 случаях из 74 для белков L и G соответственно), чем два других для обоих белков.

4. На примере белка L показано, что механическая стабильность белковой глобулы определяется не только мотивом и компактностью укладки вторичных структур белка, но и особенностями и составом аминокислот в соединяющих их нерегулярных участках (петлях) полипептидной цепи.

5. Установлено, что поверхностные слои аминокислот белков из термофильных и мезофильных организмов достоверно отличается по своему аминокислотному составу и по среднему числу межатомных контактов на остаток.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Глякина А.В., Лобанов М.Ю., Галзитская О.В. Поиск структурных факторов, ответственных за стабильность белков из термофильных организмов // *Молекулярная биология*. 2007. Т. 41. № 4. С. 681–687.
2. Glyakina A.V., Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Yu., Galzitskaya O.V. Different Packing of External Residues Can Explain Differences in the Thermostability of Proteins from Thermophilic and Mesophilic Organisms // *Bioinformatics*. 2007. V. 23. № 17. P. 2231–2238.
3. Глякина А.В., Галзитская О.В., Балабаев Н.К. Молекулярная динамика разворачивания белковых глобул под действием внешних сил // *Вестник Тверского государственного университета*. Серия Химия. 2008. Т. 68. №8. С. 109–119.
4. Глякина А.В., Балабаев Н.К., Галзитская О.В. Сравнение переходных состояний иммуноглобулинсвязывающих доменов белков L и G, полученных при моделировании разворачивания под действием внешних сил и в экспериментах под действием денатуранта // *Биохимия*. 2009. Т. 74. С. 389–403.
5. Glyakina A.V., Balabaev N.K., Galzitskaya O.V. Mechanical unfolding of proteins L and G with constant force: similarities and differences // *J. Chem. Phys.* 2009. V. 131. №4. P. 045102.
6. Glyakina A.V., Balabaev N.K., Galzitskaya O.V. Multiple unfolding intermediates obtained by molecular dynamics simulations under stretching for immunoglobulin-binding domain of protein G // *The Open Biochem. J.* 2009. V. 3. P. 66–77.
7. Glyakina A.V., Balabaev N.K., Galzitskaya O.V. Two-, Three-, and Four-State Events Occur in the Mechanical Unfolding of Small Protein L Using Molecular Dynamics Simulations // *Protein and Peptide Letters*. 2010. V. 17. №1. P. 92–103.
8. Глякина А.В., Галзитская О.В., Балабаев Н.К. Исследование механических свойств иммуноглобулинсвязывающих доменов белков L и G методом молекулярной динамики // *Компьютерные исследования и моделирование*. 2010. Т. 2. №1. С. 73–81.
9. Glyakina A.V., Galzitskaya O.V. A comparative analysis of folding pathways of thermophilic and mesophilic proteins by Monte Carlo simulations // *J Bioinform Comput Biol*. 2010. V. 8. №3. P. 395–411.
10. Mamonova T.B., Glyakina A.V., Kurnikova M.G., Galzitskaya O.V. Flexibility and mobility in mesophilic and thermophilic homologous proteins from molecular dynamics and FoldUnfold method // *J Bioinform Comput Biol*. 2010. V. 8. № 3. P. 377–394.

Тезисы докладов:

11. Глякина А.В., Галзитская О.В., Балабаев Н.К. (2007) Молекулярная динамика разворачивания белковой глобулы под действием внешних сил // 11-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Россия, Пушино 2007. С. 56.
12. Глякина А.В., Балабаев Н.К., Галзитская О.В. Сравнение переходных состояний белков L и G, возникающих при моделировании их силового разворачивания и в экспериментах под действием денатуранта // II Международная конференция «Математическая биология и биоинформатика». Россия, Пушино 2008. С. 147–148.
13. Глякина А.В., Галзитская О.В., Балабаев Н.К. Исследование путей механического разворачивания белков L и G // 12-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Россия, Пушино 2008. С. 335.
14. Глякина А.В., Галзитская О.В., Балабаев Н.К. Влияние точечных аминокислотных замен на механические свойства иммуноглобулинсвязывающего домена белка L // IV Российский симпозиум «Белки и пептиды». Россия, Казань 2009. С. 314.
15. Глякина А.В., Галзитская О.В., Балабаев Н.К. Сравнение механических характеристик белков L и G // 13-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Россия, Пушино 2009. С. 258.
16. Глякина А.В., Галзитская О.В., Балабаев Н.К. Исследование механических свойств белков L и G // V Санкт-Петербургская конференция молодых учёных «Современные проблемы науки о полимерах». Россия, Санкт-Петербург 2009. С. 74.
17. Глякина А.В., Галзитская О.В., Балабаев Н.К. (2010) Влияние точечных аминокислотных замен на механические свойства иммуноглобулинсвязывающего домена белка L // VII Национальная конференция «Рентгеновское, Синхротронное излучения, Нейтроны и Электроны для исследования наносистем и материалов. Нано-Био-Инфо-Когнитивные технологии РСНЭ-НБИК 2009». Россия, Москва 2010. С. 439.
18. Глякина А.В., Галзитская О.В., Балабаев Н.К. Влияние точечных аминокислотных замен на механические свойства иммуноглобулин-связывающего домена белка L // 14-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Россия, Пушино 2010. С. 282.
19. Глякина А.В., Галзитская О.В., Балабаев Н.К. Исследование механических свойств белков методом молекулярной динамики // XV Симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул. Россия, Петрозаводск 2010. С. 94.

20. Глякина А.В., Галзитская О.В., Балабаев Н.К. Сравнение механических свойств белков L и G. // V Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры-2010». Россия, Москва 2010. 358_1.
21. Глякина А.В., Галзитская О.В., Балабаев Н.К. Молекулярно-динамическое моделирование механического разворачивания белков L и G // III Международная конференция «Математическая биология и биоинформатика». Россия, Пущино 2010. С. 177.
22. Глякина А.В., Галзитская О.В., Балабаев Н.К. Исследование механических свойств белков методом молекулярной динамики // Конференция молодых ученых «Современные проблемы теоретической физики». Украина, Киев 2010. С. 43.
23. Глякина А.В., Галзитская О.В., Балабаев Н.К. Исследование механических свойств белков методом молекулярной динамики // XVIII Международная Конференция «Математика. Компьютер. Образование». Россия, Пущино 2011. С. 61.
24. Глякина А.В., Балабаев Н.К., Галзитская О.В. Влияние структурных свойств белков на их механическую стабильность и термостабильность // IV Съезд биофизиков России. Россия, Нижний Новгород 2012. С. 74.