

На правах рукописи

Михайлюк Максим Григорьевич

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА ЭЛЕМЕНТОВ ВТОРИЧНОЙ
СТРУКТУРЫ И ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННЫЕ КОРРЕЛЯЦИИ
АТОМНЫХ ГРУПП В БЕЛКАХ**

03.00.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2003

Работа выполнена на кафедре биофизики Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор К.В. Шайтан.

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук
Р.Г. Ефремов (ИБХ РАН),

Ведущая организация: Институт Математических Проблем Биологии РАН,
г. Пущино

Защита состоится “ ” _____ 2003г. в _____ часов на заседании
Диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском Государственном Университете
по адресу: 119899, г. Москва, Воробьёвы горы, МГУ, Биологический факультет, кафедра
биофизики, новая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан “ ” _____ 2003г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук
профессор

Т.Е. Кренделева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В течение последних десятилетий исследование динамики биополимеров привлекает большое внимание. Однако, в отличие от низкомолекулярных структур, в биополимерах взаимосвязь между структурой и функциональными свойствами существенно сложнее. В настоящее время общепринято, что фундаментальные принципы функционирования биомакромолекул обусловлены также их динамическими свойствами. Пространственное строение молекул белков, наличие элементов вторичной структуры непосредственно сказывается на организации динамического поведения глобулы. Протяженные упругие элементы полипептидного каркаса организуют флуктуационную динамику белковой макромолекулы, что весьма важно для функциональной активности. В известном смысле молекулу белка можно представить как армированную каплю, состоящую из упругих элементов различной протяженности и формы, погруженных в плотную среду из боковых групп и молекул растворителя (К.В. Шайтан, А.Б. Рубин). Элементы этой конструкции испытывают ограниченное броуновское движение с параметрами, определяемыми константами жесткости упругого каркаса и микровязкостью внутрибелковой среды. Понимание физических принципов механического устройства белковых глобул и сходных наноструктур необходимо для развития технологии молекулярного конструирования и биоинженерии.

Динамические свойства белков исследуются практически всеми самыми современными физическими методами, такими как водородный обмен, спиновая метка, флуоресценция, лазерная спектроскопия, рассеяние нейтронов, рассеяние синхротронного излучения, мессбауэровская спектроскопия, ЯМР, диффузное рассеяние рентгеновских лучей (ДРРЛ). Одним из важных инструментов исследования структуры и закономерностей конформационного поведения биологических макромолекул является метод молекулярной динамики, позволяющий получать детальную информацию о процессах, происходящих в системе на уровне движений отдельных атомов. В его основе лежит расчет классических (ньютоновских) траекторий движения макромолекулы в фазовом пространстве координат и импульсов ее атомов. Этот метод очень быстро развивается вместе с прогрессом в компьютерных технологиях и становится все более популярным инструментом исследований для молекулярных биологов, биохимиков, биофизиков и представителей смежных специальностей. В настоящее время этот метод оказывается чрезвычайно полезным при постановке вычислительных экспериментов по сравнительному изучению динамических свойств белков при направленной вариации их структуры. Таким образом, использование метода молекулярной динамики для изучения временных корреляций, характеризующих динамику белков и фрагментов их вторичной и третичной структуры, а также пространственных корреляций, сопровождающих конформационные перестройки биомакромолекул при изменении внешних условий, актуально и необходимо для детального понимания процессов, происходящих в живых системах на молекулярном уровне. При этом самостоятельный интерес представляет задача обработки экспериментальных данных с использованием результатов молекулярной динамики и применением фурье-преобразования к анализу экспериментальных кривых.

Целью работы является исследование динамики элементов вторичной структуры в составе молекул белка и в виде изолированных молекулярных структур, изучение пространственных и временных корреляций атомных групп, характеризующих динамику биомакромолекул при изменении внешних условий, сравнительное изучение роли дисульфидных связей в конформационной подвижности белков, использование результатов молекулярной динамики для обработки данных ДРРЛ, а также разработка методов фурье-анализа данных ДРРЛ и соответствующего программного обеспечения для получения информации о динамике водно-белковых систем.

Для достижения этих целей необходимо было поставить и решить следующие основные задачи:

1. С помощью метода молекулярной динамики провести изучение динамики элементов вторичной структуры белка (α -спиралей и β -слоев) в виртуальной вязкой среде и в составе молекул белков (барназа, лизоцим). Исследовать температурное плавление α -спирали.
2. Провести сравнение параметров изгибных флуктуаций α -спиралей, получаемых при использовании в методе молекулярной динамики силовых полей amber84 и amber96, соответствующих тяжелоатомной и полноатомной модели белка.
3. С помощью метода молекулярной динамики провести вычислительный эксперимент по сравнительному изучению динамических свойств лизоцима при направленной вариации его структуры (разрушению дисульфидных связей).
4. Применить метод молекулярной динамики к обработке экспериментальных данных по ДРРЛ лизоцимом с различными степенями гидратации.
5. С помощью метода фурье-анализа данных ДРРЛ изучить динамику пространственных корреляций в глобулярных и мембранных белках, при изменении внешних условий (степени гидратации).
6. Провести сравнительное изучение пространственных перестроек в глобулярных белках разного строения (миоглобин (α -белок), лизоцим ($(\alpha+\beta)$ -белок)) и мембранных белках (белки РЦ пурпурных бактерий *Rh. sphaeroides* и *Rps. viridis*) при изменении степени гидратации.

Научная новизна. Впервые проведено исследование динамики элементов вторичной структуры белков (α -спиралей и β -слоев) в составе молекул белка (лизоцим, барназа) и в виде изолированных молекулярных структур. Впервые исследована точность континуального приближения для α -спиралей и β -структур.

Впервые проведен вычислительный эксперимент по сравнительному изучению динамических свойств лизоцима при направленной вариации его структуры (разрушению дисульфидных связей).

Впервые проведено сравнение параметров изгибных флуктуаций α -спиралей, получаемых при использовании в методе молекулярной динамики силовых полей amber84 и amber96, соответствующих тяжелоатомной и полноатомной модели белка.

Впервые применен метод молекулярной динамики к обработке экспериментальных данных по ДРРЛ лизоцимом с различными степенями гидратации.

Впервые с помощью метода фурье-анализа данных ДРРЛ изучена динамику пространственных корреляций в глобулярных и мембранных белках, при изменении внешних условий (степени гидратации).

Впервые проведено сравнительное изучение пространственных перестроек в глобулярных белках разного строения (миоглобин (α -белок), лизоцим ($(\alpha+\beta)$ -белок)) и мембранных белках (белки РЦ пурпурных бактерий *Rh. sphaeroides* и *Rps. viridis*) при изменении степени гидратации.

Практическая ценность работы. Установление неоднородности и нелинейности упругих элементов вторичной структуры белков (α -спиралей и β -слоев) имеет важное значение как для развития общей теории динамики биополимеров, так и для понимания взаимосвязи динамики и функций молекул.

Проведение с помощью молекулярной динамики вычислительного эксперимента для изучения влияния дисульфидных мостиков на конформационную подвижность лизоцима в случае, когда постановка подобного биохимического эксперимента практически невозможна, позволило интерпретировать имеющиеся существенные различия в величинах среднего квадрата смещения атомных групп $\langle \Delta x^2 \rangle$, которые наблюдаются в экспериментах по РРМИ для лизоцима и миоглобина. Этот результат дает хорошие основания для активного применения вычислительных экспериментов при изучении динамических свойств белков.

Использование метода молекулярной динамики для обработки экспериментальных данных по ДРРЛ позволило получить данные по динамике водно-белковых систем. Применение в дальнейшем экспериментальных методов одновременно с расчетами молекулярной динамики приведет к получению новых сведений о конформационном поведении биологических макромолекул.

Разработанный метод фурье-анализа данных ДРРЛ и соответствующее программное обеспечение позволили изучить динамику пространственных корреляций в глобулярных и мембранных белках, при изменении внешних условий (степени гидратации) и могут в дальнейшем использоваться для получения информации о динамике водно-белковых систем.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на II съезде биофизиков России (Москва, 1999), на VI и VII научных конференциях ИХФ РАН, (2000, 2001), на 4-th International Conference on Biological Physics (Kyoto, Japan, 2001), ICAME-2001 (GB, Oxford), на III съезде биохимического общества (С.-Петербург, 2002), International conference 'Mössbauer spectroscopy and its applications' (St.-Petersburg, 2002), V International congress on mathematical modeling, (Dubna, 2002). Работа также докладывалась на семинарах кафедры биофизики Биологического факультета МГУ и кафедры дифференциальной геометрии Механико-математического факультета МГУ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ и 3 приняты в печать.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа (страниц) состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы (ссылок), иллюстрирована рисунками и содержит таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. В первой главе представлен литературный обзор по методам молекулярной динамики и результатам компьютерного изучения динамики белков. Описываются вычислительные методы, использованные в данной работе, и осуществляется выбор оптимальных условий для расчёта динамики молекул. Приводится протокол расчетов молекулярной динамики. Численное моделирование динамики молекул проводилось с использованием программного комплекса молекулярно-динамических вычислений MoDyp 1.13 build 1a (МГУ, Биологический факультет).

2. Во второй главе содержится литературный обзор по использованию метода рассеяния рентгеновских лучей для изучения надатомной структуры веществ, содержащих атомы одного и нескольких типов. Описаны модели (метод субчастиц, метод шаров, метод кубиков и др.), используемые для получения информации о структуре биомacroмолекул при прямой обработке данных ДРРЛ.

3. В третьей главе по аналогии с описанием изгибных флуктуаций ДНК тепловые флуктуации элементов относительно жесткого α -спирального каркаса представляются в континуальной модели с различными граничными условиями. Для свободной α -спирали, моделируемой упругим стержнем с подпертыми концами флуктуационный профиль определяется средним квадратом смещения в каждой точке Z стержня:

$$\langle [\Delta x(Z, t)]^2 \rangle \approx A^2 (1 - \exp(-t/\tau_\alpha)) \sin^2(\pi Z/L),$$

где $A = (\frac{8}{\pi^5} kT \frac{L^3}{ER^4})^{1/2}$ - средняя амплитуда флуктуаций в центре стержня;

$\tau_\alpha = \frac{4c\eta_p}{\pi^5 E} (\frac{L}{R})^4$ - время релаксации изгибных флуктуаций. Здесь L – длина, $R \approx 2.3 \text{ \AA}$ – радиус, E – модуль Юнга, η_p – микровязкость среды, c – коэффициент трения для единицы длины стержня определяемый из гидродинамических соображений.

Задача об изгибных флуктуациях β -структур рассматривается сходным образом: β -слой моделируется пластиной толщиной $2h$ ($h \sim 1\text{\AA}$). В случае прямоугольной пластины с ребрами длиной $L_1 \sim L_2 \sim L$ и подпертыми краями получаем:

$$\langle [\Delta x(Z, y, t)]^2 \rangle \approx B^2 (1 - \exp(-t/\tau_\beta)) \sin^2(\pi y/L_1) \sin^2(\pi Z/L_2).$$

Для β -слоя амплитуда флуктуаций в центре пластины и время τ_β равны:

$$B \approx (\frac{kT}{30Eh^3})^{1/2} L, \quad \tau_\beta = \frac{0,05\eta_p}{E} (\frac{L}{h})^3.$$

Изучалось влияние температуры на модуль Юнга, амплитуды флуктуаций и времена корреляции отклонения оси α -спирали от ее среднего положения. В качестве модельных объектов были взяты полилизин и полиглицин (PolyLys, PolyGly) в α -спиральной конформации (длина спирали $L=44\text{\AA}$), состоящие из 30 аминокислотных остатков, а также самая протяженная (H) α -спираль миоглобина ($L=35.5\text{\AA}$), состоящая из 26 остатков 13 различных типов. Полилизин в отличие от полиглицина имеет достаточно объемные боковые радикалы и напоминает “щетку”. В табл. 1 представлены результаты обработки траекторий этих полипептидов, рассчитанных при температурах 300K и 400K. N- и C-концы α -спиралей в данном случае фиксировались. Приведенные в табл.1 значения параметров соответствуют центральной части α -спирали. Видно, что при повышении температуры от 300K до 400K наблюдается уменьшение значений модуля Юнга и увеличение амплитуды смещения центральной части α -спирали относительно ее оси. При этом, как и следовало ожидать, большие значения модуля Юнга характерны для полилизина $E=9.4 \cdot 10^{12} \text{ эрг/см}^3$ (для полиглицина $E=4.1 \cdot 10^{12} \text{ эрг/см}^3$). При 400K отклонение центра α -спирали от оси составляет $\sim 1.1\text{-}1.2\text{\AA}$ для всех исследованных полипептидов, тогда как время корреляции этого отклонения существенно различается. Несколько парадоксальным выглядит увеличение характерного времени изгибных флуктуаций с повышением температуры. Это обусловлено, по-видимому, нелинейным изменением упругой энергии спирали при больших деформациях. На рис. 1 изображены амплитудные флуктуационные профили полипептидов для 300K и 400K соответственно. Следует отметить, что с повышением температуры профиль изгибных флуктуаций полиглицина не меняется, тогда как у полилизина и восьмой (H) α -спирали миоглобина этот профиль существенно деформируется и становится ближе к профилю изгибных флуктуаций полиглицина. Амплитуды флуктуаций в N-концевой части α -спирали выше, чем в центральной и в C-концевой части. То есть N-концевой участок α -спирали более динамически лабилен, чем центральный и C-концевой. Поэтому представления об α -спирали как об однородном упругом стержне (трубке) нуждаются в определенном пересмотре.

Таблица 1. Параметры изгибных флуктуаций центральной части α -спиралей с фиксированными концами (длина траектории – 5нс, столкновительный термостат).

	300 K			400 K		
	A ($\text{\AA}$)	E (эрг/см^3)	τ_a (пс)	A ($\text{\AA}$)	E (эрг/см^3)	τ_a (пс)
Полиглицин	0.9	$4.1 \cdot 10^{12}$	77	1.2	$3.2 \cdot 10^{12}$	140
Полилизин	0.6	$9.4 \cdot 10^{12}$	69	1.1	$4 \cdot 10^{12}$	202
Миоглобин (H)	0.6	$5 \cdot 10^{12}$	55	1.1	$1.9 \cdot 10^{12}$	301

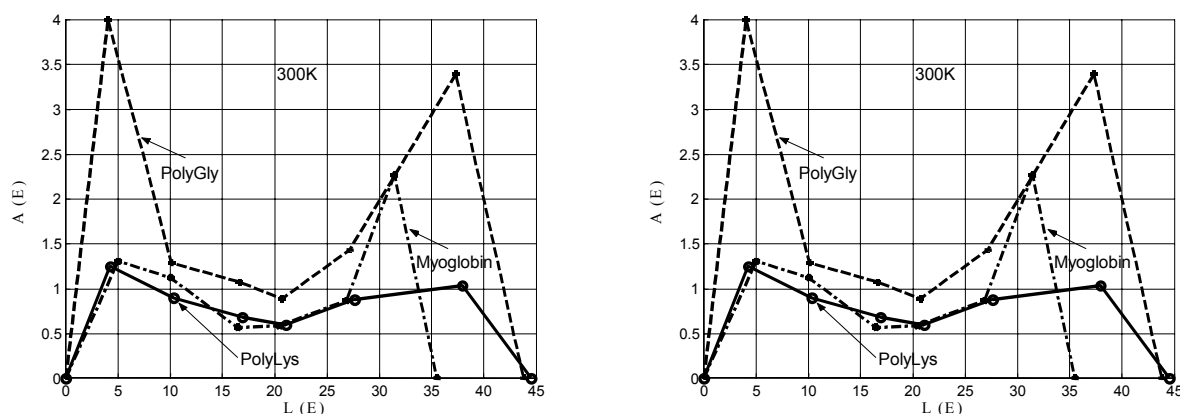


Рисунок 1. Амплитудные флуктуационные профили полипептидов при температуре 300К (слева) и 400К (справа) (-●- - полилизин, ---°--- - α -спираль миоглобина (H), --+-- - полиглицин). Концы спиралей закреплены.

Проследим далее динамику разворачивания миоглобиновой (H) α -спирали с незакрепленными концами в виртуальной вязкой среде при повышении температуры. Молекулярно динамические траектории рассчитывались как в тяжелоатомном, так и в полноатомном приближениях. В табл. 2 приводится сравнение соответствующих параметров для центральной части α -спирали. Заметное плавление α -спирали в тяжелоатомной модели за время наблюдения 5нс происходит при температуре 500К. В полноатомной модели эта температура выше – 700К. Обращает внимание значительное замедление динамики флуктуаций в полноатомной модели, что обусловлено существенным увеличением “шероховатости” поверхности потенциальной энергии при явном включении в расчет атомов водорода. Парадоксальным кажется уменьшение модуля Юнга и увеличение амплитуд флуктуаций при добавлении атомов водорода. Это указывает на значительную чувствительность отдельных динамических параметров полипептидов к вариациям параметров используемого силового поля даже в том случае, если равновесные характеристики макромолекулы остаются неизменными. Эти эффекты при наличии надежных экспериментальных данных об упругих характеристиках элементов вторичной структуры, по-видимому, могут быть использованы для уточнения силовых полей. Возможно также, что в полноатомной модели за разумные времена могут возникать более точные подстройки системы (с меньшей энергией) при движении в конфигурационном пространстве существенно большей размерности.

Таблица 2. Сравнение тяжелоатомной и полноатомной моделей α -спирали миоглобина (H) с незакрепленными концами (длина траектории – 5нс, столкновительный термостат).

Миоглобиновая α -спираль (тяжелоатомная модель)				Миоглобиновая α -спираль (полноатомная модель)			
T (K)	A (Å)	E (эрг/см ³)	τ_α (пс)	T (K)	A (Å)	E (эрг/см ³)	τ_α (пс)
300	0.97	$1.9 \cdot 10^{12}$	192	300	1.7	$5.8 \cdot 10^{11}$	294
400	1.19	$1.6 \cdot 10^{12}$	90.6	600	1.6	$1.4 \cdot 10^{12}$	318
500	1.44	$1.4 \cdot 10^{12}$	263	700	2.9	$4.9 \cdot 10^{11}$	446

Как известно, в α -спиральной конформации заданы определенные значения торсионных углов ϕ и ψ . Детали процесса плавления α -спирали можно увидеть на картах двумерных распределений по углам ϕ и ψ плотности вероятности нахождения системы в соответствующей части конфигурационного пространства. На рис. 2 представлены соответствующие карты для N- и C-концевой части миоглобиновой α -спирали (H) при температурах 300К, 600К и 700К (расчет проводился для спиралей со свободными концами). Видно, что уже при температуре 300К выбранные пары углов значительное время проводят в области, отвечающей β -конформации. Вклад этой области с

повышением температуры быстро растёт. При 600K аминокислотные остатки Ala2 и Leu26 практически все время находятся в состоянии, соответствующей β -конформации.

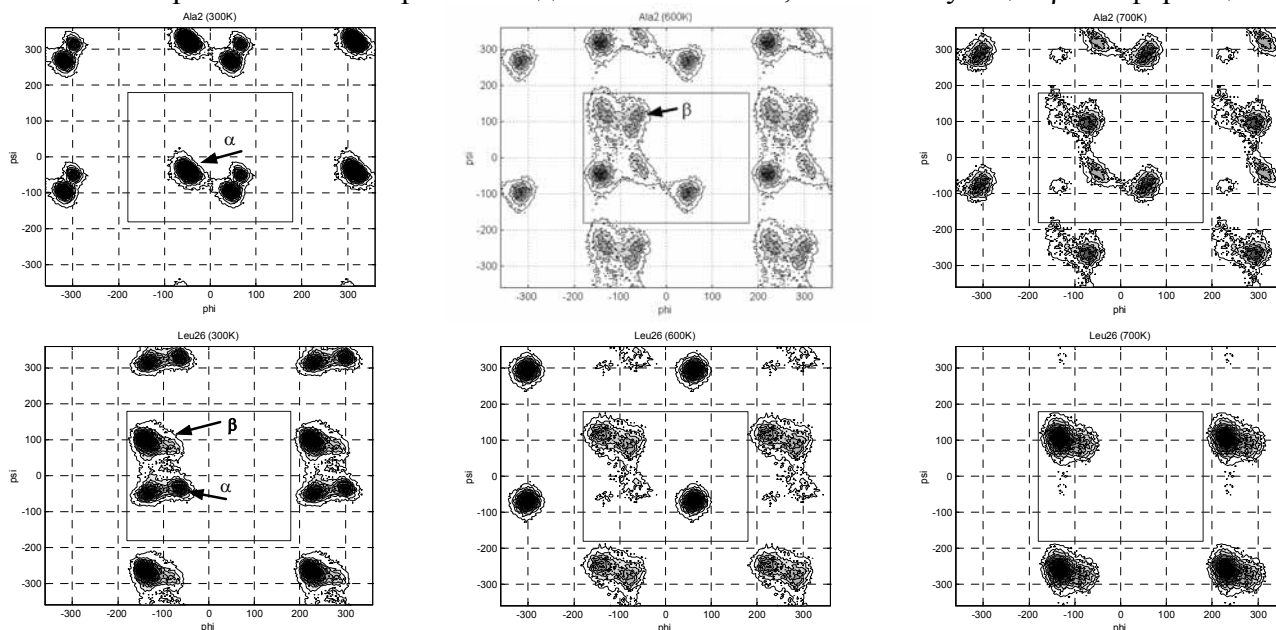


Рисунок 2. Карты плотности вероятности нахождения системы в конфигурационном пространстве по торсионным углам ϕ и ψ для аминокислотных остатков Ala2 и Leu26 соответственно с N- и C-концевой части миоглобиновой α -спирали (H) при температуре 300, 600 и 700K соответственно. Стрелками показаны области, соответствующие конформации α -спирали и β -слоя. Сплошной линией ограничена область, обычно изображаемая на картах Рамачандрана.

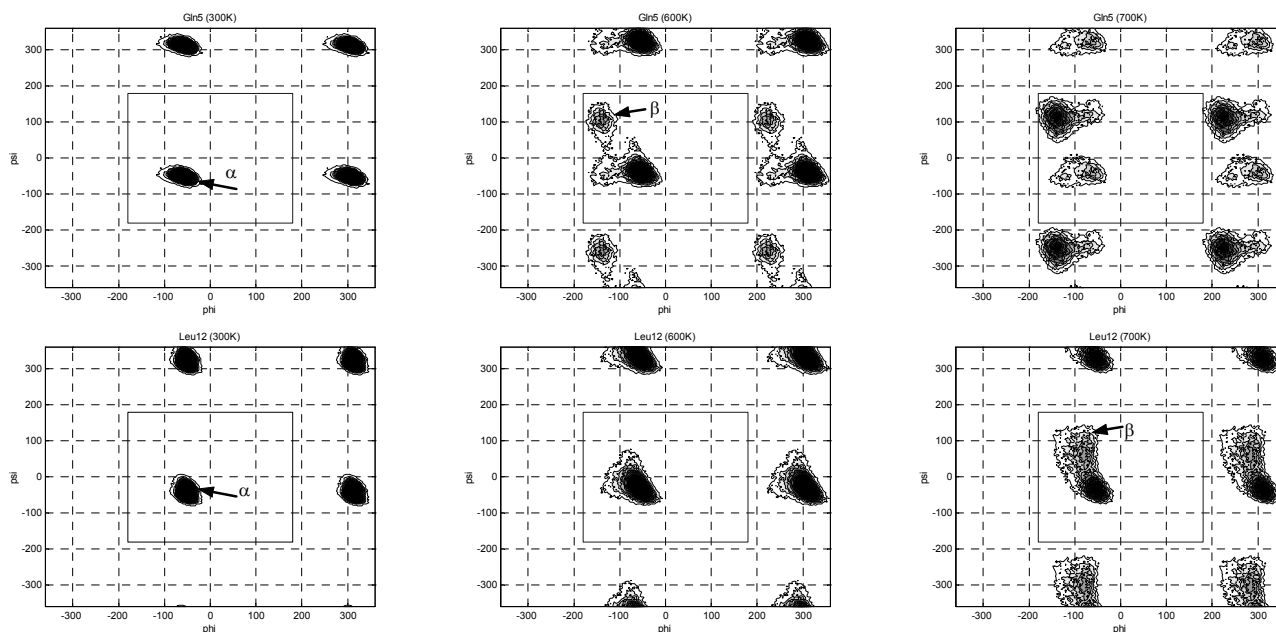


Рисунок 3. Карты плотности вероятности нахождения системы в конфигурационном пространстве по торсионным углам ϕ и ψ для аминокислотных остатков Gln5 и Leu12 из центральной части миоглобиновой α -спирали (H) при температуре 300, 600 и 700K соответственно. Стрелками показаны области, соответствующие конформации α -спирали и β -слоя. Сплошной линией ограничена область, обычно изображаемая на картах Рамачандрана.

На рис. 3 на примере аминокислотных остатков Gln5 и Leu12 из центральной части миоглобиновой α -спирали (H) показан переход из чисто α -спиральной конформации при температуре 300K в α/β -конформацию при повышении температуры до 700K. Следует отметить, что при 300K вероятность нахождения в конформации α -спирали превышает 50% для 20 аминокислот, при 600K таких аминокислот – 18, а при 700K таких

аминокислот только 12. При этом визуально полипептид практически уже не находится в конформации α -спирали (т.е. наступает момент плавления). Надо сказать, что плавление α -спирали начинается с N-конца. Так при 600K 4 аминокислоты с N-конца находились в состоянии расплавленной α -спирали, а с C-конца – 1. Соответствующие цифры для 700K составляют 7 и 3, то есть 2 витка α -спирали с N-конца и 1 виток с C-конца. Этот результат находится в хорошем согласии с приведенными выше данными по увеличению амплитуды флуктуаций в большей степени у N-концевой части α -спирали.

Процесс плавления α -спирали зависит от качественного состава аминокислот в полипептидной цепи. В случае миоглобиновой α -спирали (H) присутствие двух аминокислот Gly через 1,5 витка ускоряет процесс плавления с N-конца, а наличие аминокислот Arg и пары Ala-Lys в центральной части создает дополнительные очаги разрушения α -спирали. Отметим, что процесс плавления для тяжелоатомной модели α -спирали практически повторяет аналогичные стадии плавления в полноатомной модели.

Проводилось также изучение влияния условий закрепления концов α -спирали на ее динамику. Для этого, в дополнение к моделям с жесткой фиксацией концов α -спирали и α -спирали с незакрепленными концами, рассматривался случай, когда концы миоглобиновой α -спирали (H) в полноатомной модели были соединены с массивными частицами, масса каждой из которых составляла 1кДа (порядка 1/3 от массы всей спирали). При этом динамическое поведение в целом для всех трех случаев не менялось, модуль Юнга, амплитуда и характерное время флуктуаций оставались практически без изменения как для α -спирали с незакрепленными концами, так и для α -спирали с дополнительными массивными частицами. В то же время для α -спирали с фиксированными концами модуль Юнга был больше в 2.5 раза, а амплитуда и характерное время флуктуаций меньше в 1.5 и 3 раза соответственно, чем параметры, полученные в двух других случаях.

Для изучения динамических свойств β -слоя в качестве объекта был выбран участок размером $25.6 \times 23 \text{ \AA}$ протяженного β -листа в белке GFP. β -слой содержал 6 антипараллельных β -цепей и состоял из 100 аминокислот. Динамика β -слоя изучалась в полноатомной модели при температуре 300K. Длина траектории составляла 5нс. Влияние растворителя моделировалось виртуальной вязкой средой с теми же параметрами, что и при изучении динамики α -спирали. Периметр β -слоя не закреплялся. Как было показано выше, фиксация элементов вторичной структуры придает им дополнительную жесткость, но принципиально не меняет их динамического поведения. В центре β -слоя динамические параметры изгибных флуктуаций имели следующие величины: $B=0.75 \text{ \AA}$, $\tau_\beta = 220 \text{ пс}$. В рамках континуальной модели это соответствует модулю Юнга: $E=7.5 \cdot 10^{11} \text{ эрг/см}^3$. Таким образом, упругие характеристики β -слоя практически те же, что и у α -спирали. На рис. 4 изображен амплитудный флуктуационный профиль β -слоя.

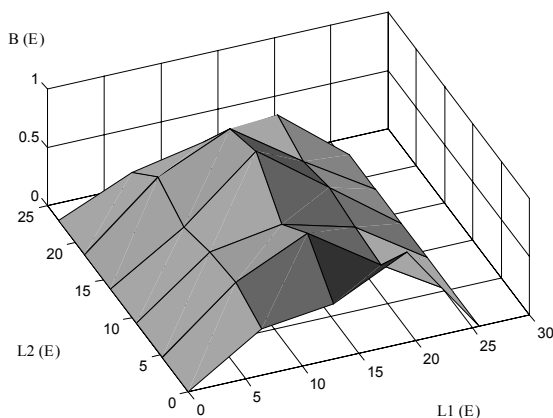


Рисунок 4. Амплитудный флуктуационный профиль β -слоя, вырезанного из белка GFP. Края β -слоя выровнены вдоль оси L2.

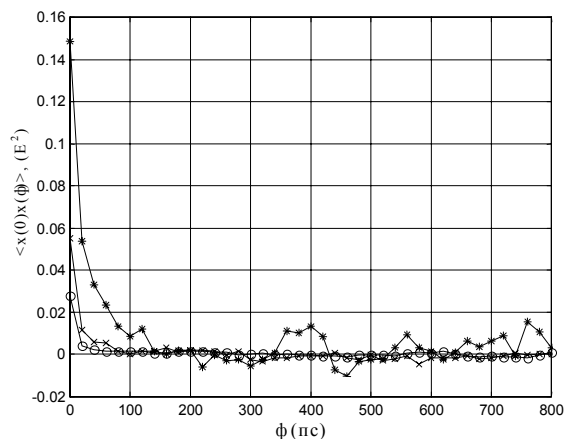


Рисунок 5. Автокорреляционные функции, характеризующие отклонения от среднего значения центральной части оси α -спирали (1а) и

β-слоя в барназе и свободной α-спирали (1α) (-o- - α-спираль (1α) в барназе, -x- - β-слой в барназе, -* - свободная α-спираль (1α)).

Для изучения динамики α-спирали и β-слоя внутри молекулы белка был выбран α+β-белок барназа, состоящий из 108 аминокислот. Длина молекулярно динамической траектории белка, исследовавшегося в полноатомном приближении, составляла 10нс. Влияние растворителя моделировалось виртуальной вязкой средой, температура термостата была равна 300К. В табл. 3 представлены значения параметров, соответствующих центральной части α-спирали (1α) (13 аминокислот, длина 15.5Å) и β-слоя (4 антипараллельные β-цепи, размер 8.5x13Å). Для удобства сравнения приведены также параметры, полученные в результате обработки молекулярно динамической траектории свободной α-спирали (1α), вырезанной из барназы.

Из табл. 3 видно, что эффективная жесткость погруженной в белок α-спирали примерно на 20% выше, чем у β-слоя в сходных условиях и в 3 раза выше, чем у свободной α-спирали. Амплитуда флуктуаций элементов вторичной структуры в белке примерно в 2 раза меньше, чем у свободной α-спирали. Это обусловлено окружением, которое не дает совершать относительно быстрые движения с большей амплитудой.

На рис. 5 приведены соответствующие автокорреляционные функции, характеризующие отклонения от оси центральной части α-спирали (1α) и β-слоя в барназе и свободной α-спирали (1α). Здесь также видно, что элементы вторичной структуры в белке ведут себя как существенно более жесткие структуры со значительно меньшими временами релаксации, чем аналогичные свободные элементы.

Таблица 3. Параметры изгибных флуктуаций центральной части α-спирали (1α) и β-слоя в барназе (T=300К, длина траектории – 10нс, столкновительный термостат).

Барназа	A (Å)	E (эрг/см ³)	τ _α (пс)
α-спираль	0.29	1.8*10 ¹²	16.4
β-слой	0.31	1.35*10 ¹²	20.1
α-спираль (свободная)	0.48	6.5*10 ¹¹	42

Таким образом, элементы вторичной структуры являются существенно неоднородными и нелинейными упругими элементами. Эффективный модуль Юнга α-спирали и β-слоя достигает максимума в центре и заметно снижается у концевых участков. Особенно это существенно у N-конца α-спирали. Динамическая структура α-спирали напоминает скорее пружину, у которой на концах витки растянуты и ослаблены. За счет этого максимумы амплитуды изгибных флуктуаций α-спирали наблюдаются в окрестности первой и последней четверти ее длины. Эффективное плавление α-спирали начинается с N-конца. В вакууме, при температуре 700К на временах порядка 5нс свыше половины аминокислотных остатков, по крайней мере, половину расчетного времени находятся в других возможных конформациях.

Модули Юнга свободной α-спирали и свободного β-слоя, рассчитанные в полноатомном приближении, составляют E=6÷8*10¹¹ эрг/см³. В составе молекулы белка модули Юнга α-спирали и β-слоя оказываются в 1.5-2 раза выше. Из-за стерических ограничений при флуктуациях этих элементов в структуре белка имеется заметное различие в амплитудах по сравнению с вырезанными из молекулы белка свободными элементами вторичной структуры. Так амплитуды флуктуаций свободной α-спирали и той же α-спирали в составе барназы различаются в 1.7 раза.

Вариации параметров потенциального поля при переходе от полноатомной к тяжелоатомной модели существенно сказываются на величине модуля Юнга и амплитуде изгибных флуктуаций элементов вторичной структуры. Это указывает на чувствительность этих динамических параметров к деталям описания силового поля и

может быть, по-видимому, использовано в дальнейшем для уточнения силовых параметров.

4. В четвертой главе методами молекулярной динамики ставится вычислительный эксперимент для изучения влияния дисульфидных мостиков на конформационную подвижность лизоцима. Отметим, что проведение подобного биохимического эксперимента практически невозможно в силу нестабильности молекулы лизоцима, лишенной дисульфидных связей. Вместе с тем, такой вычислительный эксперимент необходим для понимания общей картины динамического устройства глобулы и, в частности, для интерпретации имеющихся существенных различий в величинах среднего квадрата смещения атомных групп $\langle \Delta x^2 \rangle$, которые наблюдаются в экспериментах по РРМИ для лизоцима и, например, миоглобина, не содержащего дисульфидных связей. В работе методами молекулярной динамики были получены траектории для двух вариантов лизоцима: нативного (с S-S-связями) и модифицированного (без S-S-связей).

В работе проводилось сравнение и обработка корреляционных функций, характеризующих изгибные флуктуации самых длинных α -спиралей лизоцима 1α (10 аминокислот); 3α (12 аминокислот); 5α (11 аминокислот). Если следить за отклонением центральной части α -спиралей от ее оси, то следует отметить, что амплитудные характеристики практически не меняются для обоих вариантов лизоцима, но меняются характерные времена. В лизоциме с разрушенными S-S-связями характерные времена изгибных флуктуаций α -спиралей 3α и 5α увеличиваются приблизительно в 2-3 раза. Интересно, что две из четырех дисульфидных связей лизоцима соединены с центральной частью именно этих α -спиралей. У 1α -спирали S-S-связь приходится на N-концевую часть, и для этой спирали динамические характеристики для двух обсуждаемых вариантов молекулы лизоцима практически не менялись. На рис. 6 в качестве примера показаны автокорреляционные функции отклонения центральной части 3α -спирали от ее оси. В табл. 4 приведены результаты обработки этих автокорреляционных функций для трех α -спиралей из большого домена. Обработка проводилась в континуальной модели, в которой α -спираль моделируется упругим стержнем с подпертыми концами. Отметим, что значения эффективного модуля Юнга для двух α -спиралей увеличились при разрушении S-S-связей, что свидетельствует об общем повышении жесткости белковой конструкции.

В случае отсутствия S-S-связи анализ кросскорреляционных функций для отклонений центральной части α -спиралей от их осей обнаруживает появление заметных корреляций с длительными временами релаксации ~ 400 - 700 пс для спиралей 1α и 3α , а также 5α и 3α . В большом домене лизоцима с дисульфидными связями взаимная корреляция между α -спиралями сохраняется на временах до ~ 50 пс. Иными словами, флуктуации α -спиралей относительно друг друга в большом домене лизоцима при наличии S-S-связей становятся независимыми существенно быстрее, за времена порядка десятков пикосекунд. Сходная картина наблюдается и для кросскорреляционных функций изгибных флуктуаций α -спиралей 4α и 3α с β -слоем из малого домена.

Таблица 4. Результаты обработки автокорреляционных функций отклонения центральной части α -спирали от ее оси для α -спиралей из большого домена лизоцима.

Лизоцим (с S-S- связями) (α -спирали)	A (Å)	E (эрг/см ³)	τ_a (пс)	Лизоцим (без S-S-связей) (α -спирали)	A (Å)	E (эрг/см ³)	τ_a (пс)
1α	0.17	$1.5 \cdot 10^{12}$	4	1α	0.16	$1.66 \cdot 10^{12}$	3.4
3α	0.15	$1.9 \cdot 10^{12}$	3.2	3α	0.16	$1.66 \cdot 10^{12}$	9.1
5α	0.22	$8.9 \cdot 10^{11}$	23	5α	0.18	$1.3 \cdot 10^{12}$	43

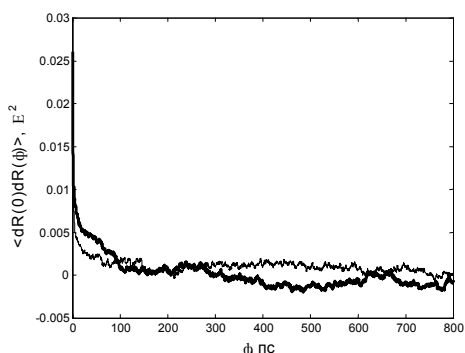


Рисунок 6. Автокорреляционные функции отклонения центральной части 3 α -спирали от ее оси для двух вариантов лизоцима (более медленное затухание (жирная линия) – лизоцим без S-S-связей).

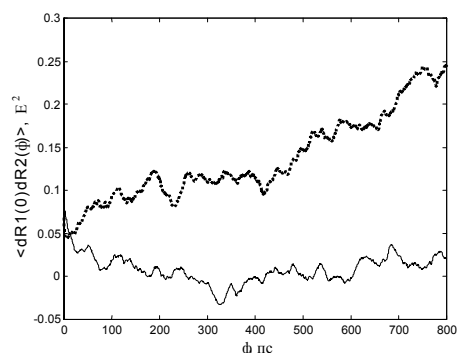


Рисунок 7. Кросскорреляционные функции отклонений от средних расстояний между C_{α} атомами аминокислотных остатков Arg21-Lys116 и Arg21-Asp101 из большого домена для двух вариантов лизоцима (жирная линия – лизоцим без S-S-связей).

То есть, как это ни парадоксально, наличие дисульфидных связей разрыхляет белковую глобулу и делает флуктуации отдельных элементов структуры более независимыми. Можно сказать, что дисульфидные связи одновременно и скрепляют участки молекулы и удерживают их от излишнего сближения, выполняя функцию “распорок”. При разрыве S-S-связей происходит нарушение функционально значимой конформации лизоцима и элементы вторичной структуры в большей степени “наезжают” друг на друга при движении.

Чувствительность к взаимным движениям в молекуле лизоцима с S-S-связями и без них можно оценить также при изучении кросскорреляционных функций отклонений от средних расстояний между C_{α} -атомами аминокислотных остатков, находящихся в вершинах петель большого и малого домена. Следует отметить, что за времена ~ 50 пс наблюдается быстрое исчезновение взаимных корреляций в присутствии дисульфидных связей между аминокислотными остатками Arg21-Lys116 и Arg21-Asp101 из большого домена (рис. 7). В случае лизоцима без S-S-связей наблюдается рост устойчивой корреляции между движениями этих петель на временном интервале ~ 800 пс. Аналогичная ситуация наблюдается для взаимных корреляций отклонений от средних расстояний между петлями большого и малого домена, т.е. между аминокислотными остатками Asp48-Asp101 и Gly71-Asp101. Этот факт подтверждает вывод о том, что в отсутствие дисульфидных связей нарушается взаимное расположение элементов вторичной и третичной структуры (большого и малого доменов) лизоцима. Это должно вести к искажению нативной конформации молекулы и в итоге к нарушению ее функции.

В табл. 5 представлены результаты обработки автокорреляционных функций отклонений от средних расстояний между боковыми радикалами аминокислотных остатков Trp62-Trp63 и Glu35-Asp52, участвующих в процессе взаимодействия лизоцима с субстратом. Следует отметить, что при разрушении S-S-связей, прежде всего, увеличиваются времена корреляции отклонений от средних расстояний между этими аминокислотными остатками (в 7-12 раз), а для остатков Trp62-Trp63 и величины отклонений от средних расстояний (в 1.5 раза), что также обусловлено существенным изменением формы и размера молекулы.

Таблица 5. Результаты обработки автокорреляционных функций отклонений от средних расстояний между боковыми радикалами аминокислотных остатков, участвующих в процессе взаимодействия лизоцима с субстратом.

Лизоцим (с S-S-связями)	A (Å)	τ_a (пс)	Лизоцим (без S-S-связей)	A (Å)	τ_a (пс)
Trp62-Trp63	0.35	3.7	Trp62-Trp63	0.5	51.5
Glu35-Asp52	0.28	17.3	Glu35-Asp52	0.29	98.7

Таблица 6. Результаты сравнения трех структур лизоцима. X_m , Y_m , Z_m – максимальные размеры при ориентации вдоль соответствующих осей координат, V – объем молекулы, $A1$, $A2$ – коэффициенты анизотропии структуры, $\langle R^{Ca}_{min} \rangle$ – среднее минимальное расстояние между Ca -атомами в молекуле, R_i – радиус инерции, N_{Ca} – число контактов между Ca -атомами молекулы, при расстояниях между этими атомами меньших $14.23\text{\AA}$.

	X_m ($\text{\AA}$)	Y_m ($\text{\AA}$)	Z_m ($\text{\AA}$)	V ($\text{\AA}^3$)	$A1$	$A2$	$\langle R^{Ca}_{min} \rangle$ ($\text{\AA}$)	R_i ($\text{\AA}$)	N_{Ca}
Лизоцим (рентген. структура)	37.14	34.43	43.64	21928	0.172	0.035	3.8	14.07	1356
Лизоцим (структура с S-S-связями, усреднение по 2нс)	37.16	33.54	44.77	22038	0.235	0.055	3.88	14.23	1301
Лизоцим (структура без S-S-связей, усреднение по 2нс)	39.48	31.52	38.49	21609	0.205	0.004	3.88	13.95	1373

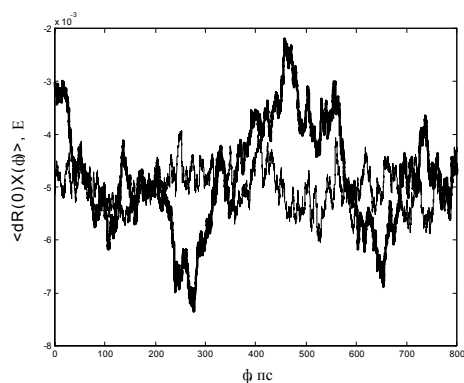


Рисунок 8. Кросскорреляционные функции между отклонением центральной части 5α-спирали от ее оси и поворотом вокруг торсионного угла χ в аминокислотном остатке Trp63 для двух вариантов лизоцима (жирная линия – лизоцим без S-S-связей).

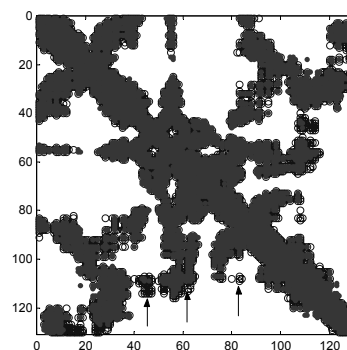


Рисунок 9. Карты контактов для двух вариантов лизоцима: с дисульфидными мостиками (точки) и без них (кружки). Учитываются Ca -атомы с взаимными расстояниями меньше $14.23\text{\AA}$. По осям обозначены номера аминокислотных остатков. Стрелками обозначены новые области на карте контактов, появляющиеся для лизоцима без S-S-связей.

Конформация “щели” между большим и малым доменом лизоцима непосредственно связана с наличием дисульфидных связей. При разрушении дисульфидных связей сильно меняется характер кросскорреляций между изгибными флуктуациями спирали 5α и поворотом вокруг торсионного угла χ в аминокислотных остатках Trp63 (рис. 8) и Asp101, участвующих в ферментативной реакции.

Путем усреднения по последнему 2нс участку траекторий были получены две усредненные структуры лизоцима: с дисульфидными мостиками и без них. Далее было проведено сравнение этих структур и стартовой структуры, определяемой данными рентгеноструктурного анализа. Часть результатов представлена в табл. 6. В отсутствии S-S-связей меняется форма молекулы лизоцима (главной осью становится не Z , а X) и ее размеры (объем молекулы уменьшается примерно на 2% по сравнению с не модифицированной и на 1.5% по сравнению со стартовой структурой молекулы). Отметим, что различия по этим же параметрам между стартовой структурой лизоцима с S-S-связями и усредненной по последним 2 нс траектории составляют примерно 0.5%. Следует отметить, что минимальные расстояния между Ca -атомами в молекуле лизоцима,

определяемые рентгеноструктурными данными, в среднем, на $0.08\text{\AA}$ меньше, чем соответствующие расстояния в обеих структурах, получаемые из траекторий молекулярной динамики. То есть аминокислотные остатки в структуре лизоцима по данным рентгеноструктурного анализа оказываются сближены. Введение в явном виде атомов водорода в тяжелоатомную структуру молекулы приводит к достаточно быстрой ее релаксации (за десятки пикосекунд). Вследствие того, что аминокислотные остатки в стартовой структуре сближены, количество контактов между $\text{C}\alpha$ -атомами (при одинаковых пространственных размерах) должно увеличиваться по сравнению со структурой лизоцима с дисульфидными мостиками, что, и наблюдается в табл. 3. Вычислялось число контактов между $\text{C}\alpha$ -атомами, для которых расстояние составляло менее $14.23\text{\AA}$ (радиуса инерции лизоцима с дисульфидными связями). Без дисульфидных связей количество таких контактов возрастает, что согласуется с выводом об уменьшении объема молекулы (при сохранении минимальных расстояний между $\text{C}\alpha$ -атомами). Наибольшим значением радиуса инерции характеризуется лизоцим с S-S-связями, а наименьшим – без дисульфидных связей. Коэффициент анизотропии $A1$, демонстрирующий отклонение от сферической формы, минимален для молекулы лизоцима, определяемой рентгеноструктурными данными, а коэффициент анизотропии $A2$, демонстрирующий отклонение от цилиндрической формы, минимален для лизоцима без S-S-связей. Средний квадрат смещения $\langle \Delta x^2 \rangle$ $\text{C}\alpha$ -атомов между стартовой структурой лизоцима и структурой лизоцима с S-S-связями, определяемый после совмещения этих структур, составляет $1.39\text{\AA}^2$, тогда как аналогичный $\langle \Delta x^2 \rangle$ после совмещения молекул с дисульфидными связями и без них - $1.75\text{\AA}^2$.

Совмещение карт контактов (изображений всех областей молекулы, для которых расстояния между $\text{C}\alpha$ -атомами будут меньше некоего выбранного $R=14.23\text{\AA}$ (радиус инерции лизоцима с S-S-связями)) для двух вариантов лизоцима с дисульфидными мостиками и без них (рис. 9) демонстрирует появление новых областей на карте контактов для лизоцима без S-S-связей. Имеет место сближение следующих групп аминокислотных остатков: 43-48 (петля в малом домене) и 109-114 (7 α -спираль в большом домене), 63-65 (петля в малом домене) и 109-114 (7 α -спираль в большом домене), 80-85 (4 α -спираль в малом домене) и 106-108 (петля в большом домене). Это говорит о сближении большого и малого доменов в лизоциме без дисульфидных связей и о нарушении конфигурации “щели” между доменами.

На основе анализа авто- и кросскорреляционных функций изгибных флуктуаций α -спиралей в большом домене лизоцима можно сделать вывод, что меньшие значения величины среднего квадрата смещения $\langle x^2 \rangle$ для лизоцима (по сравнению с α -спиральным глобулярным белком миоглобином), определяются прежде всего архитектурой строения молекулы лизоцима ($\alpha+\beta$ -белок) в силу большей эффективной жесткости β -слоя, а не наличием дисульфидных связей. Амплитуды флуктуаций элементов вторичной структуры лизоцима практически не меняются при разрушении дисульфидных связей. В большом домене лизоцима с S-S-связями α -спирали очень быстро (за времена порядка десятков пикосекунд) теряют взаимную динамическую корреляцию и в дальнейшем их движения происходят независимо. В лизоциме, в отсутствие дисульфидных связей, сильно (в 3-7 раз) увеличиваются характерные времена движений элементов вторичной структуры, и практически исчезает “щель” между большим и малым доменом, что должно драматическим образом сказаться на функции белка. Анализ авто- и кросскорреляционных функций отклонений от средних расстояний между боковыми радикалами аминокислотных остатков, участвующих в процессе взаимодействия лизоцима с субстратом подтверждает вывод о значительном нарушении функционально значимой конформации “щели” между большим и малым доменом лизоцима в отсутствие дисульфидных связей.

Сравнение пространственных характеристик лизоцима с дисульфидными связями и без них и структуры лизоцима, определяемой рентгеноструктурными данными, показало,

что рентгеноструктурные координаты тяжелых атомов задают напряженную конформацию молекулы в системе потенциалов amber 96. После добавления водородов эта конформация быстро релаксирует (за времена порядка десятков пикосекунд).

В лизоциме за счет S-S-связей обеспечивается большой объем молекулы, который задает больший радиус инерции ($14.23\text{\AA}$) по сравнению с молекулой без дисульфидных связей ($13.95\text{\AA}$). В отсутствие S-S-связей примерно на 2% уменьшается объем молекулы, прежде всего за счет “щели” между большим и малым доменом лизоцима. Можно сказать, что S-S-связи не только “скрепляют” элементы вторичной структуры белка за счет ковалентных связей, но и играют роль “распорок”, поддерживая постоянным объем молекулы, необходимый для осуществления ее функций.

5. В пятой главе описывается нахождение функции радиального распределения атомов с помощью интегрального Фурье-преобразования данных интенсивности ДРРЛ. Изучение небольших изменений структуры, влияющих на динамические свойства и функциональную активность, таких сложных систем, как белки (миоглобин, лизоцим, белки реакционного центра (РЦ) пурпурных бактерий и т.п.), с помощью фурье-анализа практически не проводилось. Это связано, прежде всего, с существенной неупорядоченностью структуры этих систем, что, в свою очередь, затрудняет получение функции радиального распределения для многоатомного случая. Мы хотим показать, что решение этой задачи в одноатомном (моноатомном) приближении дает хорошие результаты и позволяет улавливать слабые изменения структуры (около $0.1\text{\AA}$), что практически невозможно в обычном рентгеноструктурном анализе кристаллизованных белков. Положительным основанием для применения моноатомного приближения является преобладание вклада в интенсивность рассеяния от биообъектов атомов С, N и О, для которых близки как угловые зависимости, так и интенсивности атомных факторов рассеяния.

Была разработана методика определения функции радиального распределения с помощью Фурье-преобразования экспериментально измеренной интенсивности диффузного рентгеновского рассеяния. Разработанная математическая программа следовала логике статей. Обработка экспериментальных данных интенсивности ДРРЛ проводится в несколько этапов. Вначале учитываются поправки на абсорбцию и поляризацию и получаются скорректированные значения интенсивности (I_{corr}). Далее в программе рассчитываются интенсивности когерентного (I_{coh}) и некогерентного (комтоновского) (I_{inc}) рассеяния:

$$I_{inc}(Q) = R(\Theta) \sum_{i=1}^N X_i F_i(Q), \quad I_{coh}(Q) = \sum_{i=1}^N X_i f_i^2(Q).$$

Здесь X_i – стехиометрический коэффициент, отвечающий количеству атомов типа i в одной молекуле, Q – волновой вектор, $F_i(Q)$ – комтоновский фактор рассеяния от атома типа i , f_i – атомный фактор рассеяния, а $R(\Theta)$ – поправочный множитель Брейта-Дирака, связанный с релятивистской формой волнового уравнения:

$$R(\Theta) = \frac{1}{\left[1 + \frac{2\lambda h}{mc} \left(\frac{\sin \theta}{\lambda} \right)^2 \right]^3}.$$

На следующем этапе производится нормировка экспериментальных данных, получаемых в опытах по ДРРЛ в условных единицах, на рассеяние от одной молекулы. В результате мы получаем значение интенсивности рентгеновского рассеяния в электронных единицах:

$$I_T(Q) = \alpha I_{corr}(Q) - I_{inc}(Q),$$

где α – нормировочная константа, определяемая по следующей формуле:

$$-2\pi^2 \frac{N}{V} = \alpha \int_0^{Q_{\max}} Q^2 \frac{I_{\text{corr}}(Q)}{I_{\text{coh}}(Q)} dQ - \int_0^{Q_{\max}} Q^2 \left(1 + \frac{I_{\text{inc}}(Q)}{I_{\text{coh}}(Q)}\right) dQ.$$

Здесь V – объем исследуемого образца, $Q_{\max}$ – максимальное значение волнового вектора в эксперименте. Далее проводится Фурье-преобразование нормированной интенсивности рентгеновского рассеяния $i(Q)$ и нахождение функции радиального распределения атомов в виде $4\pi r(\rho(r) - \rho_0)$ из формулы:

$$4\pi r^2(\rho(r) - \rho_0) = \frac{2r}{\pi} \int_0^\infty Q i(Q) \sin Qr dQ, \text{ где } r - \text{расстояние между атомами.}$$

Особый интерес методика фурье-анализа данных ДРРЛ в моноатомном приближении представляет при изучении перестроек в структуре биомакромолекул, происходящих при изменении параметра, влияющего на динамику системы (температуры, вязкости, степени гидратации и т.п.). В наших экспериментах на белках в качестве такого параметра была взята степень гидратации. Надо сказать, что первый максимум функции радиального распределения, соответствующий расстоянию до ближайших соседних атомов (или первой координационной сфере), четко коррелирует со средней длиной ковалентной связи в биомакромолекулах. Поэтому перестройки в структуре белков на его местоположение практически не оказывают влияния. В процессе наших экспериментов мы будем следить за относительными изменениями, происходящими со следующими за первым четырьмя максимумами (или пиками) функции радиального распределения и соответственно нумеровать их, то есть второй будем называть “первым” и т.д. При этом важно отметить, что эти максимумы связаны, прежде всего, с соответствующими координационными сферами, т.е. с расстояниями от любого выбранного неводородного атома до неводородных атомов 1-го, 2-го, 3-го и т.д. порядков в структуре белка, так как вклад водородных атомов в интенсивность рентгеновского рассеяния пренебрежимо мал.

Методика фурье-анализа данных ДРРЛ была применена для исследования глобулярных и мембранных белков. В качестве глобулярных белков были взяты миоглобин и лизоцим. Выбор был не случаен, так как при помощи диффузного рассеяния рентгеновских лучей изучение структуры этих белков уже проводилось ранее, однако в основном применялись прямые методы обработки интенсивности рентгеновского рассеяния, такие как “метод шаров” и “метод кубиков”. При этом белки изучались только в растворе, и не исследовались изменения в структуре, происходящие при последовательном повышении степени гидратации. Важно также, что эти глобулярные белки имеют различную структурную организацию: миоглобин - α -белок, имеющий в качестве элементов вторичной структуры только α -спирали, лизоцим - $(\alpha+\beta)$ -белок, в котором α -спирали и β -структуры не чередуются, а скорее группируются с себе подобными так, что часть молекулы приобретает пространственную укладку α -спирального типа, другая - β -типа.

Вышеописанная методика позволила обнаружить четкую корреляцию между сдвигом “первого” максимума функции радиального распределения (или ослаблением внутриглобулярных водородных связей) и возрастанием внутримолекулярной подвижности как в миоглобине (см. рис. 10(а)), так и в лизоциме (см. рис. 10(б)). В случае миоглобина “первый” пик плавно сдвигается во всем диапазоне степеней гидратации от $2.4\text{\AA}$ (степень гидратации $h=0.05(\text{г}(\text{H}_2\text{O})/\text{г}(\text{белка}))$) до $2.9\text{\AA}$ (степень гидратации $h=0.89$). Величины и положения максимумов четырех пиков на функции радиального распределения для миоглобина и лизоцима, а также другие значения представлены в табл. 7. В случае лизоцима данный пик сдвигается от $2.5\text{\AA}$ ($h=0.05$) до $2.9\text{\AA}$ ($h=0.45$). При дальнейшей гидратации лизоцима положение “первого” максимума не изменяется.

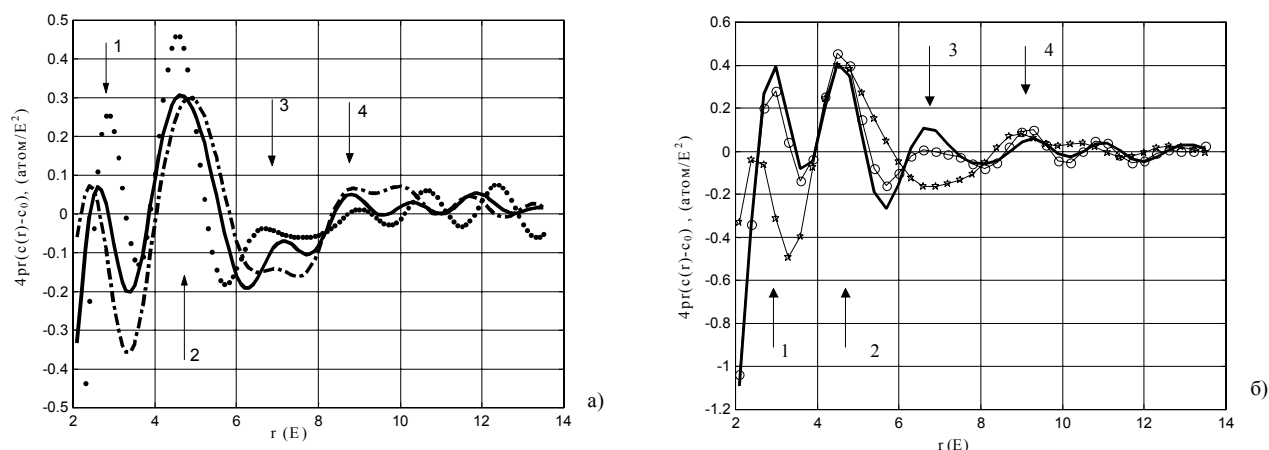


Рисунок 10. Функции радиального распределения порошковых образцов с различными степенями гидратации: (а) миоглобина (-•- – $h=0.05$, сплошная линия – $h=0.37$, точки – $h=0.89$), (б) лизоцима (-★- – $h=0.05$, -o- – $h=0.45$, сплошная линия – $h=1.0$). Стрелками указаны положения соответствующих пиков на функции радиального распределения.

Таблица 7. Результаты фурье-анализа данных по интенсивности рентгеновского рассеяния образцов миоглобина и лизоцима с различными степенями гидратации. Представлены величины и положения максимумов четырех пиков на функции радиального распределения, а также значения абсолютного отклонения между положением соответствующих максимумов при повышении степени гидратации.

Миоглобин	r (Å)	Δ (Å)	$4\pi r(\rho(r)-\rho_0)$ (атом/Å ²)	Лизоцим	r (Å)	Δ (Å)	$4\pi r(\rho(r)-\rho_0)$ (атом/Å ²)
$h=0.05$ 1 ^{ый} пик	2.4	-	0.0721	$h=0.05$ 1 ^{ый} пик	2.5	-	-0.0105
2 ^{ой} пик	4.9	-	0.2991	2 ^{ой} пик	4.6	-	0.4083
3 ^{ий} пик	8.9	-	0.0661	3 ^{ий} пик	8.9	-	0.0826
4 ^{ый} пик	10	-	0.073	4 ^{ый} пик	10.4	-	0.0386
$h=0.37$	2.6	0.2	0.0701	$h=0.28$	2.6	0.1	0.064
	4.6	0.3	0.3062		4.6	0	0.4626
	7.1	1.8	-0.0706		7	1.9	-0.0338
	8.8	1.2	0.0515		9.1	1.3	0.0862
$h=0.53$	2.7	0.1	0.1322	$h=0.45$	2.9	0.3	0.304
	4.6	0	0.3359		4.6	0	0.4652
	6.9	0.2	-0.0374		6.6	0.4	0.0054
	8.7	0.1	0.0357		9.2	0.1	0.1055
$h=0.89$	2.8	0.1	0.2533	$h=1.0$	2.9	0	0.4073
	4.6	0	0.458		4.6	0	0.421
	6.7	0.2	-0.0358		6.7	0.1	0.1153
	9.0	0.3	0.0131		9.3	0.1	0.0589

Надо отметить, что для обоих белков в функционально активном (гидратированном, $h \geq 0.45$) состоянии положение "первого" максимума достигает предельного значения в 2.9Å. При этом, с повышением гидратации, растет интенсивность этого максимума. "Второй" пик не меняет своего положения (в случае лизоцима пик лежит при 4.6Å) или слабо сдвигается в сторону меньших значений от 4.8Å до 4.6Å (при $h=0.37$) в случае миоглобина (см. рис. 10 (а) и (б)). Неоднородное уширение данного пика для обоих белков сильно уменьшается с повышением гидратации. Мы связываем это явление с упорядочением структуры глобулы при гидратации. На этих же рисунках хорошо заметно постепенное формирование "третьего" максимума при повышении степени гидратации. "Третий" пик у обоих белков с добавлением воды быстро сдвигается в сторону меньших значений и стабилизируется около 6.7Å, при этом также уменьшается

его неоднородное уширение. Этот факт существенно отличает вид функции радиального распределения для чистой воды и водно-белковых систем. Из табл. 7 видно, что поведение “четвертого” максимума при повышении гидратации в целом похоже на поведение “третьего”, однако он окончательно стабилизируется при значениях $9.0\text{\AA}$ (миоглобин) и $9.3\text{\AA}$ (лизоцим). “Третий” и “четвертый” пики, по-видимому, отвечают за формирование гидрофобного ядра и дальних взаимодействий между элементами вторичной структуры соответственно. Отличие в окончательных положениях “четвертого” максимума для лизоцима (($\alpha+\beta$)-белок) и миоглобина (α -белок) можно объяснить разной третичной структурой, которая обусловлена функциональными особенностями этих белков и в случае миоглобина позволяет сформировать более компактную упаковку элементов вторичной структуры при добавлении воды.

Результаты изучения функции радиального распределения, полученной с помощью Фурье-преобразования на основании данных по диффузному рассеянию рентгеновских лучей, позволяют сделать вывод о том, что вода, в процессе гидратации белка, ослабляет внутриглобулярные водородные связи и разрыхляет белок, что приводит к увеличению внутримолекулярной подвижности. Данная методика позволила обнаружить четкую корреляцию между сдвигом “первого” максимума интенсивности рассеяния, ослаблением внутриглобулярных водородных связей, возрастанием внутримолекулярной подвижности, как в лизоциме, так и в миоглобине и появлением заметной функциональной активности. Эти результаты хорошо коррелируют с другими экспериментальными данными по увеличению теплоемкости лизоцима, изменению диамагнитной восприимчивости, логарифма времени вращательной релаксации ЭПР метки, частоты растяжения O-D связи и т.д. Действие воды приводит также и к упорядочению макромолекулы, которая переходит из стеклообразного состояния (при $h=0.2$) в нативное (при $h=0.4-0.7$).

Методика фурье-анализа данных ДРРЛ была применена для исследования мембранных белков. Выбор в качестве объекта исследования РЦ *Rh. sphaeroides* удачно позволил изучить вклад в функцию радиального распределения белков разных типов (L+M-субъединицы РЦ - α -белки, имеющие в качестве элементов вторичной структуры только α -спирали, Н-субъединица РЦ - ($\alpha+\beta$)-белок). Ранее изменения в структуре этих белков, сопутствующие повышению гидратации, при помощи ДРРЛ не изучались.

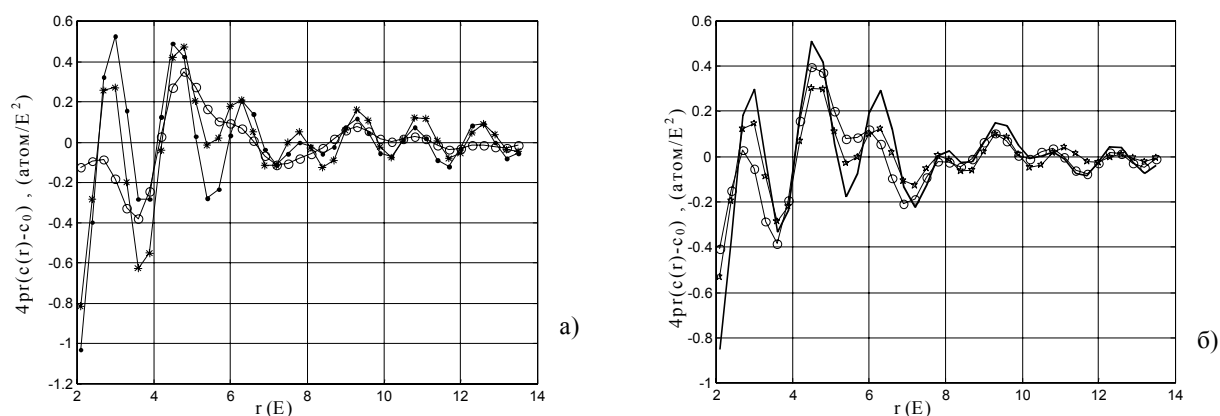


Рисунок 11. Функции радиального распределения порошковых образцов с различными степенями гидратации: (а) РЦ (L+М-субъединицы) (о – $h=0.05$, * – $h=0.27$, ★ – $h=0.61$, точки – $h=1.46$), (б) РЦ (Н-субъединица) (о – $h=0.05$, -★ – $h=0.24$).

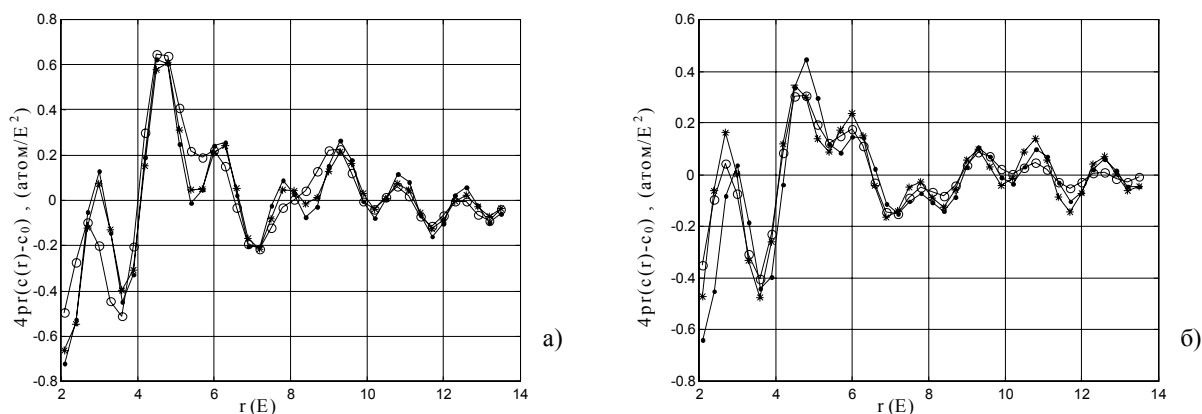


Рисунок 12. Функции радиального распределения порошковых образцов с различными степенями гидратации: (а) РЦ с цитохромом (-о- $h=0.1$, -* - $h=0.21$, -.- - $h=0.35$), сплошная линия – $h=0.51$), (б) РЦ (Н-субъединица) с различной историей гидратации (-о- –случай 1, -* - –случай 2, -.- –случай 3).

Таблица 8. Результаты фурье-анализа данных по интенсивности рентгеновского рассеяния образцов РЦ (L+M-субъединицы и Н-субъединица) с различными степенями гидратации. Представлены величины и положения максимумов четырех пиков на функции радиального распределения, а также значения абсолютного отклонения между положением соответствующих максимумов при повышении степени гидратации.

L+M- субъединицы РЦ	r (Å)	Δ (Å)	$4\pi r(\rho(r)-\rho_0)$ (атом/Å ²)	Н-субъединица РЦ	r (Å)	Δ (Å)	$4\pi r(\rho(r)-\rho_0)$ (атом/Å ²)
$h=0.05$ 1 ^{ый} пик	2.6	-	-0.0776	$h=0.05$ 1 ^{ый} пик	2.8	-	0.0324
2 ^{ой} пик	4.8	-	0.3491	2 ^{ой} пик	4.6	-	0.4176
3 ^{ий} пик	6.0	-	0.093	3 ^{ий} пик	6.0	-	0.1208
4 ^{ый} пик	9.3	-	0.0773	4 ^{ый} пик	7.9	-	-0.0138
$h=0.27$	2.9	0	0.4717	$h=0.1$	2.9	0.1	0.0041
	4.7	0.1	0.5044		4.6	0	0.3326
	6.2	0.2	0.2227		6.0	0	0.0892
	7.8	1.5	0.051		7.7	0.2	0.0214
$h=0.61$	2.9	0	0.304	$h=0.24$	2.9	0	0.1787
	4.6	0.1	0.501		4.6	0	0.3317
	6.2	0	0.1641		6.2	0.2	0.1319
	7.7	0.1	0.0787		7.9	0.2	0.0108
$h=1.46$	2.9	0	0.5345	$h=0.51$	2.9	0	0.3217
	4.6	0	0.5215		4.6	0	0.5286
	6.4	0.2	0.2083		6.3	0.1	0.2957
	7.9	0.2	0.002		8.0	0.1	0.0324

На рис. 11 изображены функции радиального распределения для разных степеней гидратации образцов L+M-субъединиц и Н-субъединицы РЦ. Хорошо заметно, что в обоих случаях поведение "первого" максимума, связанного с ослаблением водородных связей и возрастанием внутримолекулярной подвижности, в целом имеет сходную с наблюдавшейся для глобулярных белков миоглобина и лизоцима картину (см. также табл. 8). Для белков РЦ в функционально активном (гидратированном, $h \geq 0.27$) состоянии положение "первого" максимума достигает предельного значения в 2.9Å. "Второй" максимум также как в случае глобулярных белков достаточно быстро с повышением степени гидратации стабилизируется при значении 4.6Å. Однако он имеет характерное отличие от глобулярных белков в дегидратированном состоянии в виде "плеча", которое затем формирует "третий" пик. Этот пик постепенно начинает смещаться в сторону больших значений (в противоположность глобулярным белкам) до 6.3÷6.4Å. При этом уменьшается неоднородное уширение "второго" и "третьего" максимумов, что говорит об

упорядочении структуры белкового комплекса РЦ. Поведение "четвертого" пика в основном оказывается сходным для мембранных и глобулярных белков, хотя его положение стабилизируется при заметно меньших значениях $7.9 \div 8.0 \text{ \AA}$. Все эти результаты говорят о том, что пространственная упаковка в мембранных белках гораздо более плотная, чем в глобулярных, что, безусловно, связано с отличиями в формировании активного центра в гидрофобной и гидрофильной среде.

Сравнивая между собой функции радиального распределения L+M-субъединиц РЦ и Н-субъединицы РЦ, можно сказать, что с повышением степени гидратации быстрее стабилизируется Н-субъединица (при $h=0.24$), чем L+M-субъединицы (при $h \geq 0.4$). Это, по-видимому, основано как на различиях в структуре (α -белки и $(\alpha+\beta)$ -белок)), так и на особенностях расположения в мембране. Мы знаем, L+M-субъединицы представляют собой пучок параллельных α -спиралей, полностью находящихся внутри мембраны, тогда как Н-субъединица частично экспонирована во внешнюю среду, а частично закорена в мембране. Следствием этого может быть то, что при гидратации отдельные элементы РЦ, выделенные из мембраны, по-разному реагируют на добавление воды, а значит, и с разной скоростью формируют компактную стабильную структуру.

Для понимания этого факта, были получены данные ДРРЛ на образцах РЦ пурпурных бактерий *Rps. viridis*. Эти образцы содержали все субъединицы РЦ вместе с цитохромом *c*, который расположен с внутренней стороны фотосинтетической мембраны и непосредственно взаимодействует с бактериальной фотосинтетической системой, принимая участие в восстановлении первичного донора электрона. Этот белковый комплекс РЦ аналогичен РЦ *Rh. sphaeroides*, но последний выделяется без цитохрома *c*. На рис. 12(а) изображены функции радиального распределения для разных степеней гидратации на образцах РЦ вместе с цитохромом *c*. Прекрасно видно, что белковый комплекс РЦ стабилизируется, т.е. переходит в функционально активное состояние, начиная со степени гидратации $h=0.21$. Характер изменений функции радиального распределения при повышении гидратации практически повторяет тот, что мы наблюдали для РЦ *Rh. sphaeroides* (L+M-субъединиц и Н-субъединицы). Заметно, что у "второго" максимума также имеется "плечо", которое затем образует "третий" пик. При этом формируется компактная структура. Быстрый переход белкового комплекса РЦ в стабильное состояние при добавлении сравнительно небольшого количества воды обусловлен тем, что в дегидратированном состоянии этот комплекс находится в конформации близкой к активной. Поэтому конформационные перестройки в элементах вторичной и третичной структур, необходимые для обеспечения процесса переноса электрона, в случае полного комплекса РЦ происходят быстрее при повышении степени гидратации, чем для отдельных его субъединиц.

Интересно также было изучить: насколько в процессе дегидратации образуются сходные и близкие по плотности упаковки конформации для одного и того же белка. Для этого Н-субъединица РЦ *Rh. sphaeroides* была подвергнута следующей процедуре. Она была последовательно три раза полностью дегидратирована, а затем к ней добавлялась вода до степени гидратации $h=2$. В дегидратированном состоянии была измерена интенсивность ДРРЛ, а затем проведена процедура фурье-анализа данных ДРРЛ. Результаты представлены на рис. 12(б). Хорошо видно, что функции радиального распределения практически идентичны во всех трех случаях, т.е. плотность упаковки элементов вторичной структуры в белке остается одинаковой. Это свидетельствует о том, что конформационные перестройки в биосистемах, сопровождающие процесс дегидратации (а, следовательно, и гидратации) идут одними и теми же или достаточно близкими путями по гиперповерхности потенциальной энергии биомакромолекул. Этот результат является еще одним подтверждением теории ренатурации белков, высказанной К.Анфинсеном.

При изменении степени гидратации порошковых образцов РЦ наблюдался кооперативный переход в стабильное состояние при $h \sim 0.3 \div 0.4$, что хорошо согласуется с

результатами других экспериментов. Он проявлялся в смещении максимумов пиков функции радиального распределения к своим предельным значениям, обусловленным конформационными перестройками в элементах вторичной структуры, обеспечивающих формирование активного центра и гидрофобного ядра (т.е. нативной структуры макромолекулы).

Очевидно, что при гидратации биомacroмолекулы происходит перераспределение электронной плотности по сетке водородных связей. Это, в свою очередь, разрыхляет структуру и обеспечивает появление внутриглобулярной подвижности, необходимой для проявления функциональной активности. Таким образом, результаты фурье-анализа данных ДРРЛ непосредственно количественно показывают влияние воды на формирование биоструктур. С одной стороны, роль воды состоит в стабилизирующем вкладе от гидрофобных взаимодействий, а с другой – в разрыхлении сетки водородных связей, ведущем к появлению конформационной подвижности в макромолекулах. Подобные, но лишь качественные, выводы делались и на основании других методик. Полученные результаты дают серьезные основания для дальнейшего использования интегрального Фурье-преобразования при анализе структурных перестроек в биологических системах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОоды

Таким образом, в данной работе для понимания физических принципов механического устройства белковых глобул с помощью метода молекулярной динамики было проведено изучение динамики элементов вторичной структуры белка (α -спиралей и β -слоев) в виртуальной вязкой среде и в составе молекул белков (барназа, лизоцим), в том числе исследовалось температурное плавление α -спирали. На примере белка лизоцима было изучено влияние дисульфидных связей на динамику элементов вторичной структуры и конформационные перестройки, происходящие в системе в их отсутствие. Предложен метод фурье-анализа данных ДРРЛ, позволяющий отслеживать динамику пространственных корреляций в биомacroмолекулах, вызванных конформационными перестройками в системе, при изменении внешних условий (температуры, вязкости, степени гидратации и т.п.). Этот метод был применен к сравнительному изучению пространственных перестроек в глобулярных белках разного строения (миоглобин (α -белок), лизоцим ($(\alpha+\beta)$ -белок)) и мембранных белках (белки РЦ пурпурных бактерий *Rh. sphaeroides* и *Rps. viridis*) при изменении степени гидратации.

На основании изложенных выше результатов можно сделать следующие выводы:

1. Элементы вторичной структуры являются существенно неоднородными и нелинейными упругими элементами. Эффективный модуль Юнга достигает максимума в центре и заметно снижается у концевых участков α -спирали и на периферии β -слоя. Наименьшее значение модуля Юнга характерно для участков близких к N-концу α -спирали. Динамическая структура α -спирали напоминает скорее пружину, у которой на концах витки растянуты и ослаблены. За счет этого максимумы амплитуды изгибных флуктуаций α -спирали наблюдаются в окрестности первой и последней четверти ее длины.
2. Модули Юнга свободной α -спирали и свободного β -слоя, рассчитанные в полноатомном приближении, составляют $E=6\div 8\cdot 10^{11}$ эрг/см³. В составе молекулы белка модули Юнга α -спирали и β -слоя оказываются в 1.5-2 раза выше. Из-за стерических ограничений при флуктуациях этих элементов в структуре белка имеется заметное различие в амплитудах по сравнению с вырезанными из молекулы белка свободными элементами вторичной структуры. Амплитуды флуктуаций свободной α -спирали и той же α -спирали в составе барназы различаются в 1.7 раза.
3. Амплитуды изгибных флуктуаций α -спиралей в большом домене лизоцима определяются строением молекулы ($\alpha+\beta$ -белок), а не наличием дисульфидных связей. В большом домене лизоцима с S-S-связями α -спирали очень быстро (за времена порядка десятков пикосекунд) теряют взаимную корреляцию и в дальнейшем их движения происходят независимо. В лизоциме, в отсутствие дисульфидных связей, сильно (в 3-7

раз) увеличиваются характерные времена движений элементов вторичной структуры, что должно драматическим образом сказаться на функции белка.

4. В лизоциме за счет S-S-связей обеспечивается больший объем молекулы, который задает больший радиус инерции ($14.23\text{\AA}$) по сравнению с молекулой без дисульфидных связей ($13.95\text{\AA}$). В отсутствие S-S-связей на $\approx 2\%$ уменьшается объем молекулы, прежде всего за счет “щели” между большим и малым доменом лизоцима. Можно сказать, что S-S-связи не только “скрепляют” элементы вторичной структуры белка за счет ковалентных связей, но и играют роль “распорок”, поддерживая постоянным объем молекулы, необходимый для осуществления ее функций.

5. Эффективное плавление α -спирали начинается с N-конца. В вакууме, при температуре 700K на временах порядка 5нс свыше половины аминокислотных остатков, по крайней мере, половину расчетного времени находятся в других возможных конформациях.

6. Рентгеноструктурные координаты тяжелых атомов задают напряженную конформацию молекулы в системе потенциалов amber 96. После добавления водородов эта конформация быстро релаксирует (за времена порядка десятков пикосекунд). Вариации параметров потенциального поля при переходе от полноатомной к тяжелоатомной модели существенно сказываются на величине модуля Юнга и амплитуде изгибных флуктуаций элементов вторичной структуры биомакромолекулы. Это указывает на чувствительность этих динамических параметров к деталям описания силового поля и может быть использовано в дальнейшем для уточнения силовых параметров.

7. По данным фурье-анализа диффузного рассеяния рентгеновских лучей вода, в процессе гидратации глобулярных белков с различным строением - миоглобина (α -белок) и лизоцима ($(\alpha+\beta)$ -белок), ослабляет внутриглобулярные водородные связи и разрыхляет их третичную структуру. Обнаружена четкая корреляция между сдвигом максимума функции радиального распределения, соответствующего второй координационной сфере, к предельным значениям в $\approx 2.9\text{\AA}$, ослаблением внутриглобулярных водородных связей, возрастанием внутримолекулярной подвижности и появлением заметной функциональной активности, как в лизоциме, так и в миоглобине. Установлена связь максимумов, соответствующих четвертой и пятой координационным сферам, с формированием гидрофобного ядра и дальними взаимодействиями между элементами вторичной структуры биомакромолекул. Отличие в окончательных положениях этих максимумов для лизоцима и миоглобина обусловлено различиями в третичной структуре. Миоглобин по сравнению с лизоцимом формирует более компактную упаковку элементов вторичной структуры при добавлении воды. Действие воды приводит к упорядочению макромолекул, которые переходят из стеклообразного состояния (при $h=0.2$) в нативное (при $h\approx 0.4$ для лизоцима; $h\approx 0.7$ для миоглобина).

8. При изменении степени гидратации порошковых образцов мембранных белков (белки РЦ пурпурных бактерий *Rh. sphaeroides* и *Rps. viridis*) наблюдается кооперативный переход в стабильное состояние при $h\sim 0.3\div 0.4$. Максимум функции радиального распределения, соответствующий третьей координационной сфере, этих белков имеет характерное отличие от глобулярных белков в дегидратированном состоянии в виде “плеча”, которое с повышением степени гидратации формирует следующий максимум. Пространственная упаковка в мембранных белках более плотная, чем в глобулярных. Это связано с отличиями в формировании активного центра в гидрофобной и гидрофильной среде.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. К.В. Шайтан, А.К. Васильев, С.С. Сарайкин, М.Г. Михайлюк. ‘Динамические свойства, электронное строение и функциональная активность радиопротекторов’. Биофизика, 1999, т. 44, № 4, с.668-675.
2. М.Г. Михайлюк, С.С. Сарайкин ‘Броуновский осциллятор в водном окружении. По данным метода молекулярной динамики’. VI научная конференция ИХФ РАН, 2000, с.22-23.

3. М.Г. Михайлюк, С.В. Есин, Ю.Ф. Крупянский, А.П. Мороз, П.П. Нокс, И.П. Григорьев, 'Влияние гидратации на стабилизацию структуры реакционных центров пурпурных бактерий. Результаты фурье-анализа данных диффузного рассеяния рентгеновских лучей (ДРРЛ)'. Седьмая научная конференция ИХФ РАН, 2001, с.46.
4. Ю.Ф. Крупянский, С.В. Есин, М.Г. Михайлюк, Г.В. Ещенко, 'Влияние гидратации на структурно-динамические характеристики лизоцима и миоглобина. Данные рэлеевского рассеяния мёссбауэровского излучения (РРМИ) и диффузного рассеяния рентгеновских лучей (ДРРЛ)'. Седьмая научная конференция ИХФ РАН, 2001, с.55.
5. Krupyanskii Yu.F., Esin S.V., Eshenko G.V., Mikhailyuk M.G. 'Spatio-temporal features of protein specific motions. The influence of hydration'. Abstracts of the 4-th International Conference on Biological Physics, 2001, B1-6, P.8, Kyoto, Japan.
6. Krupyanskii Yu.F., Esin S.V., Eshenko G.V., Mikhailyuk M.G. 'Equilibrium fluctuations in lysozyme and myoglobin' Proceedings of ICAME 2001, T4-9, P.63, Institute of Physics, Oxford.
7. К.В. Шайтан, М.Г. Михайлюк, К.М. Леонтьев, С.С. Сарайкин, А.А. Беляков 'Молекулярная динамика изгибных флуктуаций элементов вторичной структуры белков'. Биофизика, 2002, Т. 47, №3, с.411-419.
8. Yu.F. Krupyanskii, S.V. Esin, G.V. Eshenko, M.G. Mikhailyuk 'Spatio-temporal features of protein specific motions. The influence of hydration'. Journal of Biological Physics, 2002, V. 28, p.139-145.
9. M.G. Mikhailyuk, K.V. Shaitan, "Molecular dynamics of α -helix and β -structures as molecular component of protein and as isolated molecular structures in the virtual viscous medium". V International congress on mathematical modeling, Dubna, 2002, V.2, p.243.
10. M.G. Mikhailyuk, S.V. Esin, Yu.F. Krupyanskii, 'Disulfide bridges effect on dynamics of lysozyme. According to the methods of molecular dynamics'. V International congress on mathematical modeling, Dubna, 2002, V.2, p.242.
11. Ю.Ф. Крупянский, С.В. Есин, Г.В. Ещенко, М.Г. Михайлюк, Д.А. Москалев, О.Д. Ветров, 'Пространственно-временные характеристики специфических белковых движений в миоглобине и лизоциме'. III съезд биохимического общества, С.-Петербург, 2002, с.497.
12. Yu.F. Krupyanskii, S.V. Esin, G.V. Eshenko, M.G. Mikhailyuk 'Equilibrium fluctuations in lysozyme and myoglobin'. Hyperfine Interactions, 2002 (in press).
13. К.В. Шайтан, А.А. Беляков, К.М. Леонтьев, С.С. Сарайкин, М.Г. Михайлюк, К.Б. Егорова, М.В. Орлов 'Геометрия энергетической поверхности и конформационная динамика: от углеводов - к белкам и пептидам'. Химическая физика, 2003, №2.
14. Ю.Ф. Крупянский, С.В. Есин, М.Г. Михайлюк, Г.В. Ещенко 'Пространственно-временные характеристики специфических белковых движений в миоглобине и лизоциме'. Химическая физика, 2003, №2.