

¹ студентка 5 курса физико-математического факультета, СГПУ

² доцент кафедры физики, СГПУ

e-mail: maksim.kampo@mail.ru, ap_kostikov@mail.ru

КООПЕРАТИВНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МОЛЕКУЛЕ АЛЬФА-СПИРАЛЬНОГО БЕЛКА.

Механизмы процессов сворачивания белков в оптимальную структуру – одна из самых сложных проблем современной биофизики. Один из элементов предполагаемых механизмов – кооперативные процессы, т.е. процессы в которые вовлечены одновременно несколько молекулярных групп. В данной работе стояла задача в рамках метода молекулярной динамики найти способы наблюдения кооперативных процессов в молекуле, а также исследовать влияние на них различных воздействий и особенностей первичной структуры молекулы. В результате для молекулы, состоящей из четырех альфа-спиралей удалось показать, что взаимодействия спиральных участков носят характер кооперативных взаимодействий и могут зависеть от молекулярных групп, отстоящих от этих участков на большие расстояния.

Ключевые слова: молекулярная динамика, белки, кооперативные процессы.

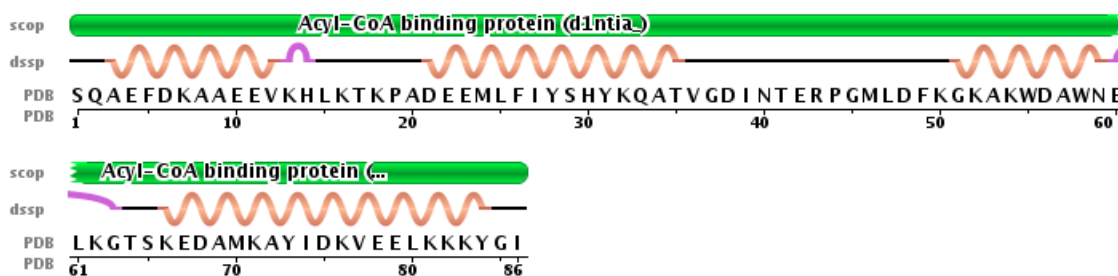
Сворачивание белков – один из фундаментальных процессов в живых организмах. Хорошо известно, что аминокислотные последовательности и процессы сворачивания белков оптимизированы во всех организмах, однако природа этих механизмов остается неизвестной, хотя некоторые успехи в понимании таких процессов имеются.

В частности, есть понимание, что должны существовать механизмы, ускоряющие поиск оптимальной структуры. Один из элементов таких предполагаемых механизмов – кооперативные процессы, т.е. процессы в которые вовлечены одновременно несколько молекулярных групп. Идея о кооперативности процесса самосборки белка в той или иной степени разрабатывалась многими авторами [1-3]. В частности, Дилл [2] обратил внимание на то, что в существующих моделях кооперативность носит локальный характер. В самом деле, если интересоваться только такими упорядоченными участками белковой цепи как спирали, то каждые четыре соседних в аминокислотной последовательности аминокислотных остатка быстро находят конформацию спирали, стабилизированной водородными связями.

Локальность поиска оптимальной конформации означает локальность относительно первичной структуры (участвуют только соседние в цепи аминокислоты). Однако кроме локальной кооперативности следует учитывать и возможные нелокальные взаимодействия. Именно они могут приводить к появлению различных форм третичной структуры.

В нашей работе стояла задача в рамках метода молекулярной динамики найти способы наблюдения кооперативных процессов, а также попытаться выяснить, как зависят кооперативные процессы от различных воздействий на молекулу и от особенностей ее первичной структуры.

В качестве исследуемой молекулы мы выбрали молекулу, состоящую из четырех альфа-спиралей, образующих компактный «пучок», код белка в базе данных белков – 1NTI. Белок 1NTI состоит из 86 аминокислотных остатков, 1391 атома, молекулярный вес – 9932 Дальтон. Его аминокислотная последовательность в виде однобуквенных кодов представлена ниже.



Для исследований использовался либо белок 1NTI (рис.1), либо его мутанты, т.е. производные белка, в которых исходные аминокислотные остатки мы заменяли на остатки других аминокислот. Как правило, при мутациях мы заменяли нативные (исходные, естественные) остатки на остаток аланина. Эта процедура отражалась в названиях мутантов-белков. Например, название R44A означает, что 44-й остаток P (proline)-пролин заменен на остаток A (alanine)-аланин.

Молекулярно-динамическое моделирование (МДМ) выполняли с помощью программы NAMD /4/. Для воздействий на белок, приводящих к нарушениям его пространственной структуры, использовали как повышение температуры образца, так и методы механического воздействия на молекулы - управляемую молекулярную динамику (УМД). Процедура подготовки молекулы к моделированию (симуляции) динамики проводилась по нашей стандартной методике /6/, которая состояла из следующих обязательных процедур: растворение в воде, приведение в равновесие системы белок-вода при нормальных условиях (температуре и давлении). Процедуры УМД были аналогичны процедурам, разработанным ранее /7/.

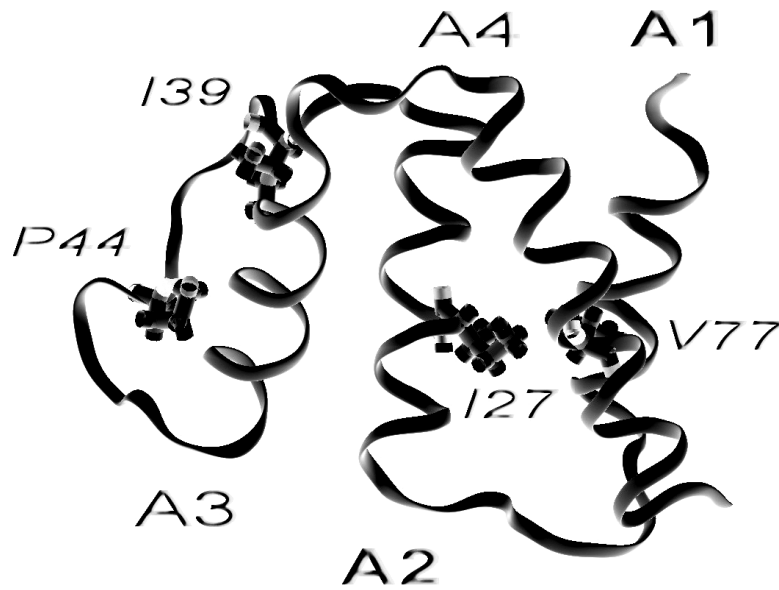


Рис. 1: Пространственная структура молекулы белка 1NTI. Основная часть молекулы показана в виде сплошной ленты, 4 альфа-спирали обозначены A1, A2, A3, A4. Аминокислотные остатки ILE27 (I27), ILE39 (I39), PRO44 (P44), VAL77 (V77) показаны в виде набора связей. Указанные остатки в молекулах-мутантах заменяли на ALA. Рисунок получен с помощью программы VMD /5/.

Поскольку нашей главной задачей было не только обнаружение, но и последующее исследование кооперативных процессов в молекуле белка, мы исследовали белок 1NTI и его мутанты всеми доступными нам методами. После анализа результатов, полученных методом увеличения температуры, мы пришли к выводу, что наблюдение кооперативных процессов при этом возможно, однако такие процессы существенно маскируются большими флуктуациями структуры молекулы.

При использовании метода УМД наиболее отчетливые результаты были получены при растягивании молекулы с постоянной скоростью. На рис.2 показаны результаты растяжения с постоянной скоростью 0,5 Ангстрем/пс для молекулы 1NTI.

На нем отображены расстояния между спиральными участками в парах: A1-A2 (верхний левый), A1-A4 (верхний правый), A2-A3 (нижний левый), A2-A4 (нижний правый).

Из рисунка видно, что в течение первых 100 пс все измеряемые расстояния были неизменны и составляли около 10 Ангстрем, т.е. растяжение молекулы не касалось взаимодействий между ее спиральными участками. В диапазоне времени 100-300 пс расстояние A2-A3 оставалось неизменным, остальные – увеличивались. В диапазоне 300-500 пс расстояние A2-A3 начало увеличиваться, при этом расстояние A1-A2 перестало изменяться, составляло 60 Ангстрем и оставалось неизменным до 500-й пикосекунды. После 500 пс все

расстояния увеличивались практически синхронно. Таким образом, наиболее интересным является диапазон от 100 до 500 пс. В этом диапазоне кооперативный характер связей между спиральными участками A1-A2 и A2-A3 проявлялся очень четко.

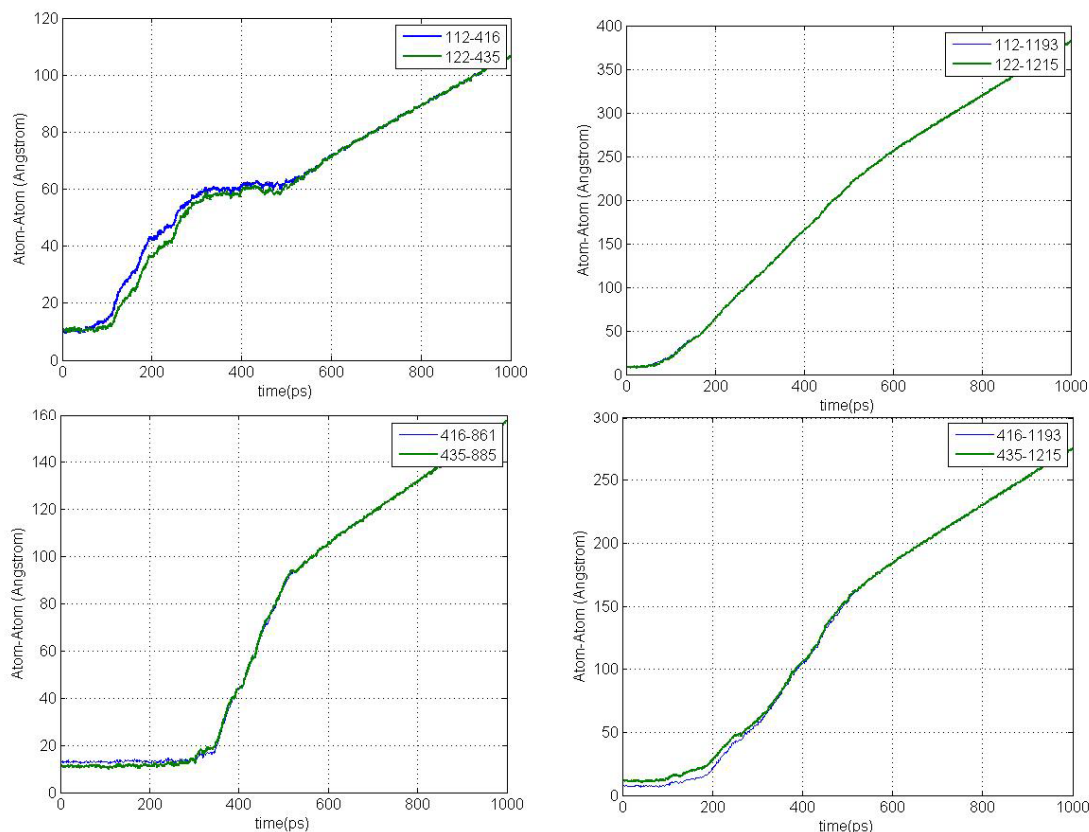


Рис. 2: Зависимости от времени расстояний между спиральными участками молекулы 1NTI при растяжении молекулы с постоянной скоростью 0,5 Ангстрем/пс при 300К.// Верхний левый рисунок – расстояние между спиральными участками A1 и A2.// Верхний правый рисунок – расстояние между спиральными участками A1 и A4.// Нижний левый рисунок – расстояние между спиральными участками A2 и A3.//

Весьма заметное влияние на характер зависимостей расстояний A1-A2, A2-A3, A2-A4 произвела мутация I39A (рис.3). Из рисунка видно, что расстояние A2-A3 в этом случае оставалось неизменным и равным 10 Ангстрем в течение 700 пс, при этом расстояние A1-A2 увеличивалось по почти линейному закону до 60 Ангстрем. Заметно изменился и характер зависимости для расстояния A2-A4, оно практически не изменялось вплоть до 300 пс, это свидетельствует о том, что силы взаимодействия между этими двумя спиральными участками стали больше, чем для исходного белка 1NTI (рис.2).

Большое влияние мутации I39A, которая произошла в периферийной области белка (рис.1), представляет особый интерес, поскольку с одной стороны мутация происходила на периферии молекулы, с другой стороны эта мута-

ція приводила к существенному влиянию на стабильность удаленных от нее частей белка (A1-A2, A2-A4).

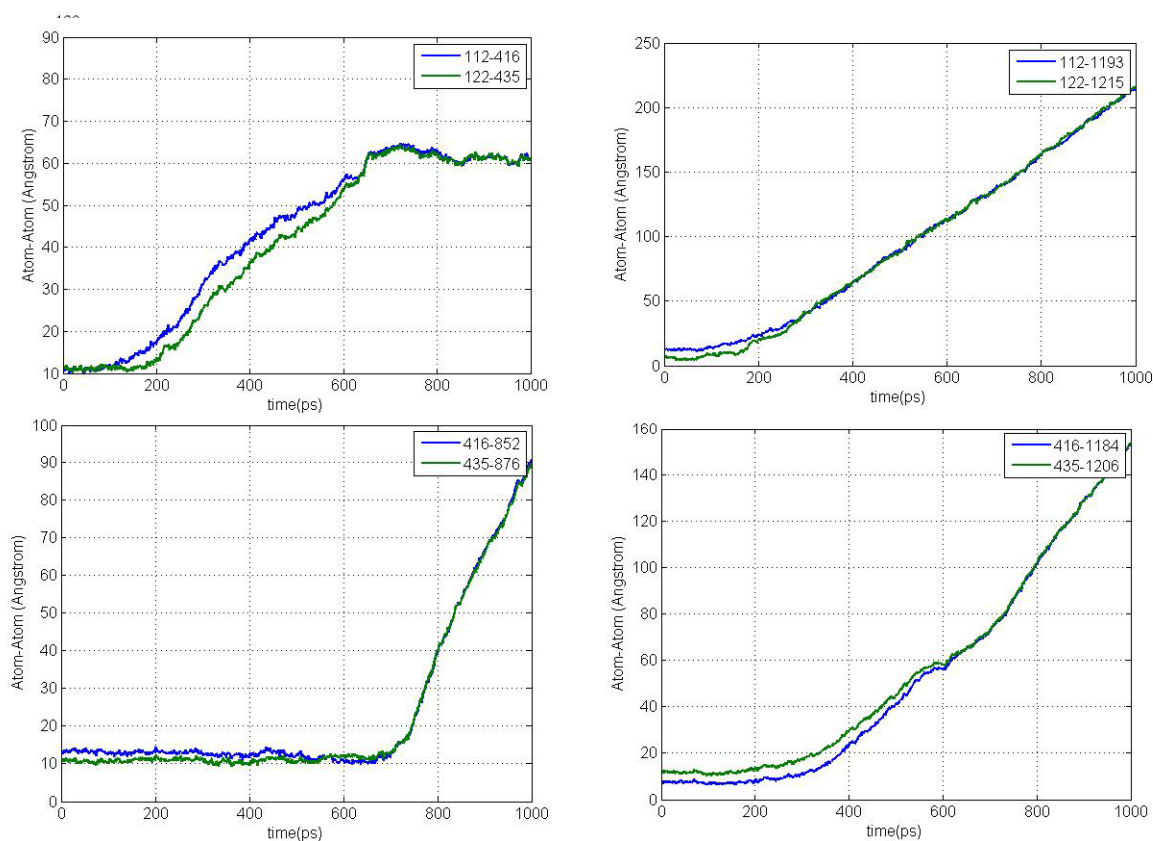


Рис. 3: Зависимости от времени расстояний между спиральными участками молекулы I39A. Остальное, как на рис.2.

Это означает, что кооперативные взаимодействия в одной части белка могут зависеть от другой, удаленной части белка. Причины такого влияния следует выяснять в последующих работах.

Таким образом, мы установили следующее.

Мутации в неструктурированной области могут влиять на образование кооперативной структуры. Две мутации (I39A и P44A) в области петли в периферийной части белка между спиралью-2 и спиралью-3 влияли на внутримолекулярный комплекс спирали -2, -3 и -4. В частности интересно, что при мутации I39A можно наблюдать не только влияние на сегменты спирали-3, но и на сегменты спирали-2 и спирали-4. Очень сильным указанием на кооперативный эффект было наблюдение, что уменьшение стабильности сегментов спирали-3 передавалось на две спирали (2- и 4-), которые взаимодействуют с другими областями белка, но не взаимодействуют с областью I39A. В противоположность другим мутациям в петле, мутация P44A благоприят-

ствовала образованию внутримолекулярных взаимодействий между сегментами спиралей-2, -3 и -4. Эта мутация не приводила к дальнедействующим взаимодействиям в нативном состоянии. Происхождение стабилизирующего влияния возможно связано с увеличением подвижности пептидной цепочки при такой мутации, что позволяло усилить взаимодействия между петлей и спиралью-3, что в свою очередь кооперативно стабилизировало промежуточные взаимодействия между двумя соседними сегментами спиралей -2 и -4.

Влияние мутаций в области спиралей иллюстрируется на примере влияния мутации V77A в сегменте спирали-4 на сегмент спирали-2, и обратный эффект мутации I27A в сегменте спирали-2 на остатки в сегменте спирали-4. Это наблюдение ясно демонстрирует, что эти две мутации в сегментах спирали-2 и спирали-4 обе сдвигают кооперативное равновесие в сторону ослабления процесса образования структуры.

Литература

- [1] *Dill K.A., Fiebig, K.M., Chan H.S.* Cooperativity in protein-folding kinetics. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1993 – 90. 1942-1946.
- [2] *Zhou Y. and Karplus M.* Interpreting the folding kinetics of helical proteins. // Nature – 1999 – 401(6751). p.400-403 .
- [3] *Bruun, S.W., Iesmantavicius, V., Danielsson, J., Poulsen, F.M.* Cooperative formation of native-like tertiary contacts in the ensemble of unfolded states of a four-helix protein. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2010 – 107. 13306-13311.
- [4] *Kale L., Skee R., Bhandarkar M., Brunner R., Gursoy A., Krawetz N., Phillips J., Shinozaki A., Varadarajan K., and Schulten K.* NAMD2: Greater scalability for parallel molecular dynamics. // J. Comp. Phys., – 1999 – 151, 283-312.
- [5] *Humphrey W., Dalke A., Schulten K.* VMD - Visual Molecular Dynamics. // J.Molec.Graphics. – 1996 – 14.1. 33-38.
- [6] *Костиков А.П.* Применение метода молекулярного динамического моделирования в биофизике. // Сборник «Пошуки і знахідки», – 2004 – Выпуск 3, Славянск, СГПУ, стр. 7-9.
- [7] *Костиков А.П., Медведева И.В.* Исследование разворачивания белков при механических возмущениях. // Сборник «Пошуки і знахідки», – 2009 – Выпуск 9, том 4, Славянск, СГПУ, стр. 112-117.