

<sup>1</sup> доктор физ.-мат. наук, доцент кафедры физики, СПбГУ

e-mail: ap\_kostikov@mail.ru

## ИССЛЕДОВАНИЕ СВРАЧИВАНИЯ АЛЬФА-СПИРАЛЬНОГО БЕЛКА МЕТОДОМ УПРАВЛЯЕМОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ.

В работе исследовались процессы разворачивания и сворачивания молекулы небольшого альфа-спирального белка методом управляемой молекулярной динамики, компьютерным аналогом атомной силовой микроскопии. Полученные данные позволяют предложить следующую последовательность событий. На начальном этапе самосборки спиральной структуры тратится относительно большое время на инициацию спирали, появление ее «зародышей», затем следуют сравнительно быстрые процессы образования спирали, следующий третий этап – длительный поиск конечной конформации белка.

**Ключевые слова:** *динамика молекулы белка, сворачивание белка, компьютерное моделирование.*

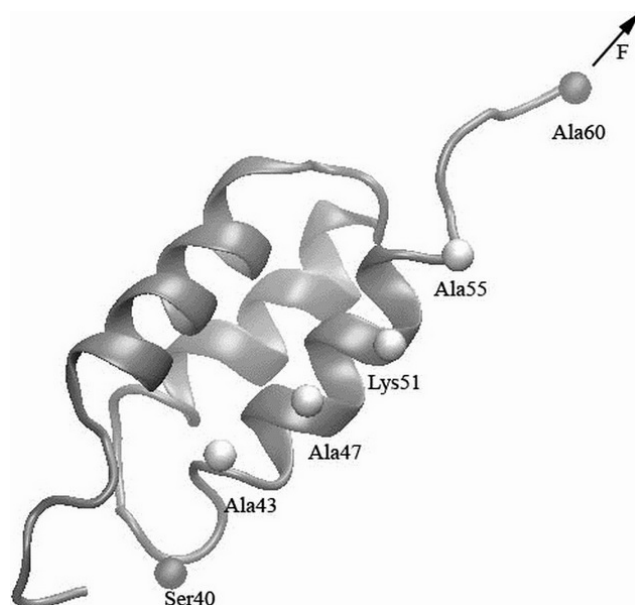
Одна из самых интересных проблем молекулярной биофизики – проблема самосборки (самопроизвольного сворачивания) белков. В пионерских работах Анфинсена [1] удостоенных в 1972 году Нобелевской премии, было доказано что конечная конформация белка (рибуноклеазы) определяется его первичной химической структурой и что процесс самосборки полностью обратим. Такая обратимость позволила развернуть в последующие годы исследования многими физическими методами во многих научных коллективах. Несмотря на все усилия, количество вопросов по механизму самосборки скорее возрастает, чем уменьшается. Некоторые, ранее неясные закономерности процесса самосборки хорошо уже выяснены, но при этом появляются все новые и новые вопросы, относящие к деталям механизмов сворачивания, разворачивания и динамической стабилизации конечной нативной структуры молекулы. В частности нет ясного понимания от чего зависит скорость сворачивания молекулы. Для некоторых белков этот процесс происходит за времена порядка микросекунд, для других – эти времена лежат в миллисекундном диапазоне. Для наблюдения за такими процессами используются, как правило, методы исследования, дающие интегральные характеристики молекул в образце, т.е. измеряются параметры, усредненные по очень большим ансамблям молекул в образце (статистические закономерности).

В течение последних лет все большее внимание исследователей привлекают методы, позволяющие наблюдать отдельную молекулу, воздействовать на нее различными способами и изучать отклик молекулы на такие воздействия. Один из таких методов появился около 20 лет назад – *Атомная Силовая Микроскопия* (АСМ). В этом методе можно контролировать силы взаимодействий между исследуемым образцом и зондом на расстояниях до нескольких десятков ангстрем. К настоящему времени метод успешно применяется для исследования биологических макромолекул. В одной из первых работ [2], использующих метод АСМ для исследования процесса разворачивания белка, авторам удалось получить интересные данные о механических свойствах молекулы гигантского мышечного белка титина. В течение последнего десятилетия возможности метода АСМ заметно расширились, в частности существенно возросла точность измерений. Параллельно с этим методом развивались методы компьютерного моделирования динамики молекулы, которую подвергают механическому воздействию. Процедура компьютерного моделирования носит название *Управляемая Молекулярная Динамика* (УМД). В этой процедуре моделируется динамика молекулы в условиях, когда один из ее атомов фиксируется в пространстве, а на любой другой атом действует управляемая сила, растягивающая молекулу. Фактически методика УМД полностью моделирует процессы, происходящие с образцом в методе атомной силовой микроскопии.

Авторам работы [3] удалось показать, что метод АСМ можно использовать не только для разворачивания молекулы, но для контролируемого сворачивания той же молекулы. В этой методике для разворачивания молекулы используется растягивающая сила порядка 500 пН, а для запуска обратного процесса растягивающую силу уменьшают в несколько раз, так чтобы мог происходить процесс самопроизвольного сворачивания молекулы. При этом подбором значения силы удается обеспечить достаточно медленное уменьшение длины вытянутой белковой цепочки, позволяющее наблюдать процесс сворачивания линейной цепочки в компактную нативную структуру в реальном времени.

В данной работе мы применили компьютерный вариант той же методики, что и авторы [3] в реальном эксперименте с использованием АСМ. Для наших исследований был выбран небольшой белок (код белка 1bdd), состоящий из 60 аминокислотных остатков, молекулярный вес – 6738 Дальтон. Белок представляет собой три  $\alpha$ -спирали, объединенных в один «пучек». На рис.1 показан общий вид этого белка,  $\alpha$ -спиральные участки показаны в виде широких лент, неструктурированные участки – в виде тонких лент. Для ис-

следований методом УМД использовался либо весь белок, либо его фрагмент, полипептидная цепь с 40 по 60 аминокислотный остаток – это соответствует  $\alpha$ -спирали на С-конце молекулы. На рисунке на этой части белка показаны атомы  $C\alpha$  соответствующих аминокислотных остатков.



**Рис. 1:** Белок 1bdd, представляющий «пучек» из трех спиралей, к которому применялся метод управляемой молекулярной динамики. На спиральном участке, который подвергался растягиванию, показан неподвижный атом  $C\alpha$  остатка Ser40 и управляемый атом  $C\alpha$  остатка Ala60. К последнему остатку приложена сила  $F$ , направленная как показано на рисунке. На рисунке показаны также атомы  $C\alpha$  аминокислотных остатков, между которыми измерялись расстояния, показанные на рис.2

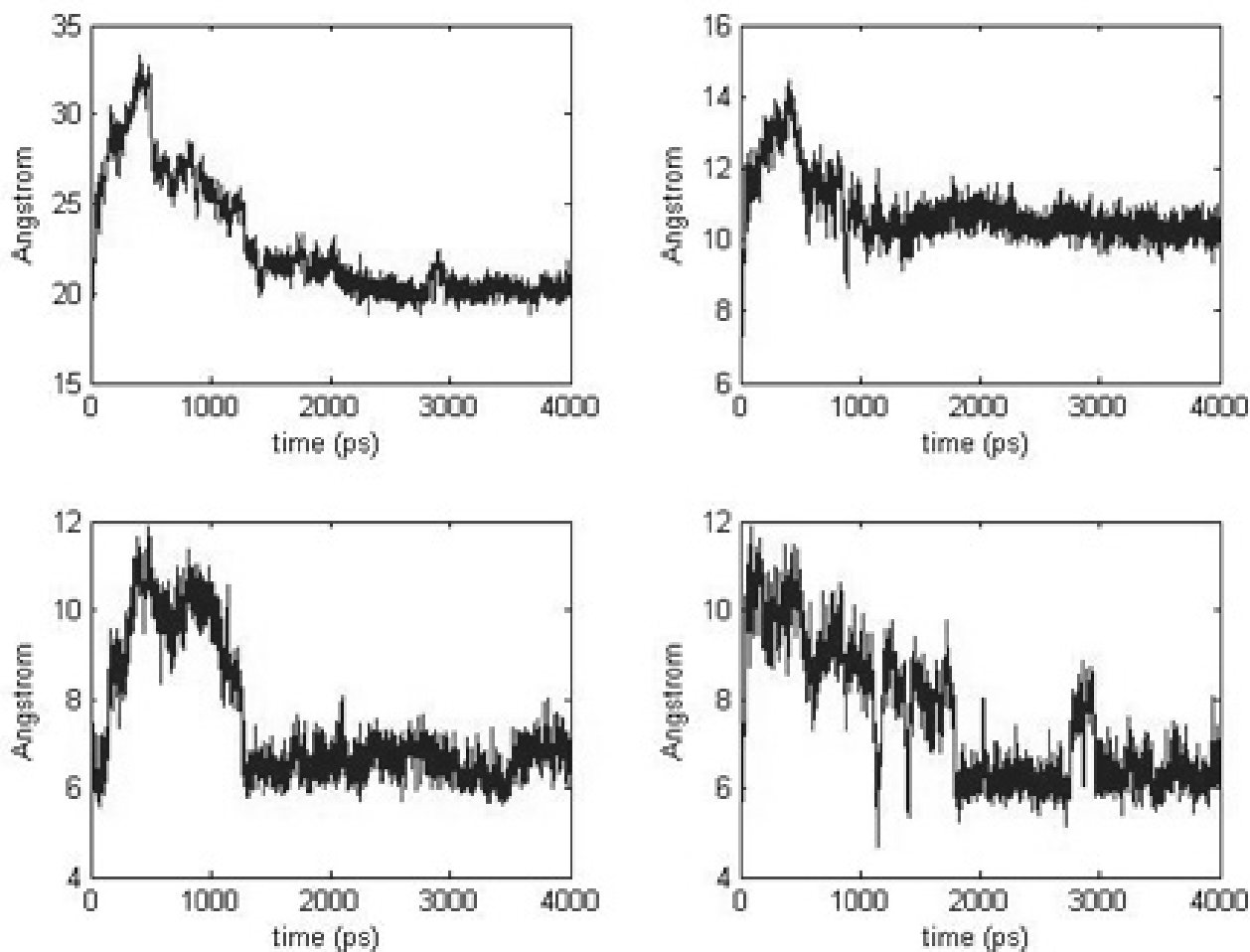
Для реализации метода компьютерного молекулярно-динамического моделирования использовалась программа моделирования NAMD [4]. Для воздействий на белок, приводящих к нарушениям его пространственной структуры, использовали методы механического воздействия на молекулы – управляемую молекулярную динамику. Процедура подготовки молекулы к компьютерному моделированию динамики проводилась по нашей стандартной методике [5], в которой присутствовали следующие обязательные процедуры: растворение в воде, приведение в равновесие системы белок-вода при нормальных условиях (температуре и давлении).

В наших исследованиях было выполнено несколько серий симуляций, каждая из которых состояла из двух частей. В первой части каждой симуляции белок или его фрагмент растягивали с заданной силой (как правило, 500 пН). В последующей симуляции силу уменьшали не менее, чем в 10 раз, в некоторых случаях эта сила полностью устранялась. Первая часть таких симуляций приводила к разворачиванию белка, за счет его механическо-

го растягивания. Во второй части симуляции молекула имела возможность вернуться в исходное состояние, приобрести первоначальную пространственную структуру. Таким образом, вторая часть наших симуляций была призвана моделировать процесс сворачивания молекулы, ее самосборку в условиях максимально приближенных к естественным условиям, воспроизводимым в пробирке. Длительность второй части симуляций были на порядок дольше, чем длительность первой части симуляции. Если первая часть выполнялась за несколько часов реального времени работы компьютера, то вторая часть продолжалась несколько суток.

В результате таких экспериментов мы обнаружили, что если белок или его спиральный фрагмент полностью вытягивается в линейную цепочку, то за время порядка 10 нс не удается наблюдать сколько-нибудь заметного возврата к спиральной структуре. Отсюда следовало, что необходимо либо заметно увеличивать длительность наблюдения, что должно приводить к увеличению длительности симуляции, либо каким-то образом изменить первую часть эксперимента (растягивание молекулы). Наиболее удачными для наших симуляций оказались следующие условия. Процедуре разворачивания подвергалась не вся молекула, а только ее часть. На рис.1 эта часть соответствует участку на С-конце полипептидной цепочки молекулы от Ser40 (фиксированный, неподвижный атом альфа-углерода) до Ala60 (управляемый атом альфа-углерода). Из рисунка видно, что на этом участке имеется три спиральных витка (Ala43-Ala47), (Ala47-Lys51) и (Lys51-Ala55). Значение силы, которую мы прикладывали к управляемому атому составляло 500 пН (пикоНьютон). Растягивание проводили не до полного разворачивания этого участка, а до первых признаков исчезновения спиральной структуры.

На рис.2 можно видеть некоторые результаты одного из таких экспериментов. В течение первых 500 пикосекунд происходило разворачивание указанного участка молекулы, при этом расстояния между атомами альфа-углерода каждого витка спирали увеличивалось от 6 Å до 12 Å. Интересно, что из 500 пс почти полное разворачивание витков спирали происходило за первые 50 пс затем весь растягиваемый участок медленно испытывал небольшое дополнительное удлинение. Затем приложенная сила уменьшалась до 50 пН и продолжалось наблюдение за молекулой. Из рисунка 2 видно, что в представленном эксперименте в течение 1000-1500 пикосекунд 2-й и 3-й витки спирали возвращались практически к исходному виду, а 1-й виток (правый верхний график) восстанавливался до несколько растянутого состояния (10 Å вместо 6 Å). Наблюдение за тем же процессом в течение 10 нс (на рисунке показаны первые 4 нс) не привело к появлению каких-либо новых тенденций.



**Рис. 2:** Зависимости от времени расстояний между парами атомов  $C\alpha$  соответствующих аминокислотных остатков в процессе управляемой молекулярной динамики. Верхний левый график – Ala43-Ala55, верхний правый график – Ala43-Ala47, нижний левый – Ala47-Lys51, нижний правый – Lys51-Ala55.

Заметим, что если в аналогичном эксперименте молекулу растягивали так, что расстояния между атомами  $C\alpha$  витка увеличивалось не до 12 Å, а до 14 Å, процесс самосборки спирального участка резко замедлялся. В наших наблюдениях в течение 10 нс признаки отдельных витков спирали появлялись, однако, процесс сборки всех витков спирали в течение нашего времени симуляции нам не удалось наблюдать. Количественной характеристикой сборки витков спирали могут служить следующие данные. Первый виток (Ala43-Ala47) оставался растянутым до 14 Å в течение всего нашего времени наблюдения, для 2-го (Ala47-Lys51) и 3-го (Lys51-Ala55) витка через 2 нс 14 Å уменьшились до 10 Å и далее изменений мы не наблюдали.

Наши результаты позволяют заключить, что в процессе протекания самосборки белка, даже такого простого, как «пучек» из трех спиралей, исполь-

зованный в нашей работе, на первом этапе должны появиться «зародыши» вторичной структуры. В данном случае, это фрагменты спиральных участков. После появления таких «зародышей», процесс упорядочивания и образования больших участков конечной структуры (в данном случае – спирального участка между 40-м и 60-м аминокислотными остатками) происходит существенно быстрее. На следующем этапе, требующем дополнительного времени, спиральные участки должны найти конечную, уникальную конформацию, завершающую самосборку белка. По-видимому для инициации спирали, появления «зародышей», требуется преодоление активационного барьера и потому образование первого витка спирали требует много больше времени, чем ее последующее удлинение еще на один виток.

Можно предположить, что под «зародышами» следует понимать сближение соответствующих молекулярных групп на определенные расстояния. Скорее всего это расстояния при которых начинают проявляться водородные связи. Хорошо известно, что именно водородные связи являются определяющими для создания и стабилизации  $\alpha$ -спиралей. В нашем случае таким расстоянием было 12 Å между атомами альфа-углерода тех молекулярных групп, которые способны образовать виток спирали.

## Литература

- [1] *Anfinsen C.B.* Principles that govern the folding of protein chains / C.B. Anfinsen // *Science*. – 1973. – vol. 181. – P. 223 – 230.
- [2] *Smith D.A.* Protein folding: Pulling back the frontiers / D.A. Smith, S.E. Radford // *Current Biology*. – 2000. – vol. 10. – P. 662 – 664.
- [3] *Fernandez J.H.* Force-Clamp Spectroscopy Monitors the Folding Trajectory of a Single Protein / J.H. Fernandez, H. Li // *Science*. – 2004. – vol. 303. – P. 1674 – 1678.
- [4] *Kale L.* NAMD2: Greater scalability for parallel molecular dynamics / L. Kale, R. Skee, M. Bhandarkar, R. Brunner, A. Gursoy, N. Krawetz, J. Phillips, A. Shinozaki, K. Varadarajan, K. Schulten // *J. Comp. Phys.* – 1999. – vol. 151. – P. 283 – 312.
- [5] *Костиков А.П.* Исследование разворачивания белков при механических возмущениях / А.П. Костиков, И.В. Медведева // Сборник «Пошуки і знахідки». – Славянск, 2009. – В. 9, Т. 4. – С. 112 – 117.