

УДК: 537.2:544.272

Исследование механических свойств иммуноглобулинсвязывающих доменов белков L и G методом молекулярной динамики

А. В. Глякина^{1,a}, О. В. Галзитская², Н. К. Балабаев¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт математических проблем биологии РАН,
142290, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, д. 4

² Учреждение Российской академии наук Институт белка РАН,
142290, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, д. 4

E-mail: ^aquark777@rambler.ru

Получено 17 марта 2010 г.

Механическое разворачивание под действием внешних сил двух похожих по пространственной структуре, но отличающихся по аминокислотной последовательности иммуноглобулинсвязывающих доменов белков L и G исследуется методом молекулярной динамики с использованием явной модели растворителя. Рассчитаны механические характеристики этих белков. Показано, что на пути механического разворачивания обоих белков появляются промежуточные состояния. Проведенные расчеты выявили три существенно различающихся пути механического разворачивания белков L и G.

Ключевые слова: молекулярная динамика, механическое разворачивание, контакты между элементами вторичной структуры

Investigation of the mechanical properties of immunoglobulinbinding domains of proteins L and G using the molecular dynamics simulations

A. V. Glyakina¹, O. V. Galzitskaya², N. K. Balabaev¹

¹ Institute of Mathematical Problems of biology RAS, 4 Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia

² Institute of Protein Research RAS, 4 Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia

Abstract. – Mechanical unfolding of two identical in structure but differ in their amino acid sequences immunoglobulinbinding domains of proteins L and G under the action of external forces have been investigating using the method of molecular dynamics with explicit model of solvent. Mechanical characteristics of these proteins have been calculated. It has been shown that in the way of the mechanical unfolding of both proteins appear intermediate states. Calculations revealed three significantly different ways of mechanical unfolding of proteins L and G.

Keywords: molecular dynamics, mechanical unfolding, contacts between elements of secondary structure

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2010, vol. 2, no. 1, pp. 73–81 (Russian).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 08-04-00561), при поддержке Российской академии наук (программы «Молекулярная и клеточная биология» (01200959110) и «Фундаментальные науки – медицине»), Фонда содействия отечественной науке, Федерального агентства по науке и инновациям (02.740.11.0295).

1. Введение

Механические свойства белков играют важную роль не только в различных биологических процессах, они также делают белки весьма перспективными структурными и функциональными элементами наноприборов и наноустройств. Для конструирования молекулярных устройств необходимо знать механические свойства лежащих в их основе макромолекул.

В атомно-силовой микроскопии при растяжении белков было обнаружено, что β -структурные белки выдерживают существенно большие нагрузки, чем α -спиральные или α/β -структурные белки. Считается, что упаковка элементов вторичной структуры белка является критическим фактором в определении его механической стабильности. Так, несколько водородных связей между соседними β -участками в β -листе стабилизируют структуру значительно сильнее, чем такое же количество гидрофобных контактов между спиральями в α -спиральных белках. Однако не существует простого соотношения между структурой белка и его механической стабильностью. Даже небольшие изменения в аминокислотной последовательности могут существенно повлиять на механические свойства белка. Направление приложения силы также является критическим фактором в определении механической стабильности [Paci, Karplus, 2000; West et al., 2006a; West et al., 2006b]. Детальное исследование путей силового разворачивания белка необходимо для понимания молекулярной природы механической стабильности белков.

Целью настоящей работы было промоделировать методом молекулярной динамики с использованием явной модели растворителя процесс силового разворачивания одинаковых по структуре, но различающихся по аминокислотной последовательности иммуноглобулинсвязывающих доменов белков L и G. Для этого белки растягивались за концы, при этом концевые атомы белков удалялись друг от друга с заданной постоянной скоростью. В работе исследуется механическая стабильность белков, анализируются пути их механического разворачивания, выявляется их сходство и различие, проводится сравнение с имеющимися экспериментальными и теоретическими данными.

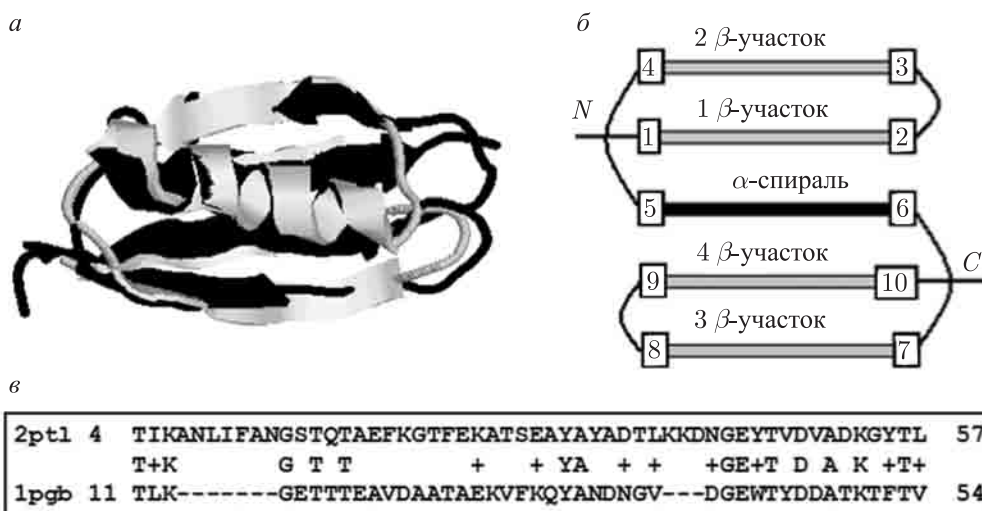


Рис. 1. а) пространственное выравнивание структур белков L и G; б) упрощенное представление белков L и G, которое в дальнейшем используется при анализе полученных данных (цифрами обозначены концы элементов вторичной структуры); в) выравнивание аминокислотных последовательностей белков L и G

2. Материалы и методы

2.1. Модели белков

В качестве объектов исследования были взяты два иммуноглобулинсвязывающих домена белков L и G (далее для краткости – белок L и белок G соответственно). Белок L (название

файла в базе белковых структур – 2ptl) состоит из 63 аминокислотных остатков (остатки с 16-го по 78-й по последовательности) и содержит 951 атом. Белок G (название файла в базе белковых структур – 1rgb) содержит 56 аминокислотных остатков (853 атома). Оба этих белка состоят из двух β -шпилек, расположенных на концах белка (N- и C-шпильки), и α -спирали между ними. Белки имеют одинаковые пространственные структуры (среднеквадратичное отклонение выравненных C α -атомов этих белков составляет 1.38 Å), но по аминокислотной последовательности они идентичны всего лишь на 15 % (рис. 1).

2.2. Метод молекулярной динамики

Исследование проводили с помощью метода молекулярной динамики с использованием программы ПУМА, разработанной в ИМПБ РАН. Решение системы классических уравнений движения атомов проводилось в полноатомном силовом поле AMBER-99 [Wang et al., 2000].

Уравнения Ньютона имеют следующий вид:

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i(r_1, \dots, r_n), \quad (1)$$

$$F_i = -\frac{\partial U(r_1, \dots, r_n)}{\partial r_i} + F_i^{\text{внешняя}}, \quad (2)$$

где $i=1, \dots, n$; m_i – масса частицы; r_i – радиус-вектор частицы; F_i – суммарная сила, действующая на атом со стороны остальных частиц; $U(r_1, \dots, r_n)$ – потенциальная энергия, зависящая от взаимного расположения всех атомов.

Потенциальная энергия представляется в виде суммы вкладов:

$$U = U_{\text{валентных связей}} + U_{\text{валентных углов}} + U_{\text{торсионных углов}} + U_{\text{плоских групп}} + U_{vdW} + U_q. \quad (3)$$

Эти вклады имеют различный функциональный вид

$$U_{\text{валентных связей}} = \sum_i K_{l,i} (l_i - l_0)^2, \quad (4)$$

$$U_{\text{валентных углов}} = \sum_i K_{\theta,i} (\theta_i - \theta_0)^2, \quad (5)$$

$$U_{\text{торсионных углов}} = \sum_i K_{\phi,i} (1 \pm \cos(n_i \cdot \phi)), \quad (6)$$

$$U_{\text{плоских групп}} = \sum_i K_{\phi,i} [1 - \cos(2\phi)], \quad (7)$$

где l_0 , θ_0 – соответствующие равновесные значения длины валентной связи и валентного угла; l , θ – их текущие значения; K_l , K_θ , K_ϕ – силовые постоянные, которые берутся из квантово-химических расчетов. Постоянные K_l , K_θ , K_ϕ и l_0 , θ_0 , n зависят от типа атомов.

Взаимодействия между атомами без валентных связей описываются с помощью потенциала Леннарда–Джонса

$$U_{vdW} = \sum_i \sum_j 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \cdot W_{vdW}(r_{ij}), \quad (8)$$

$$W_{vdw}(r_{ij}) = \begin{cases} 1, & r_{ij} < R_{on} \\ \frac{(R_{off}^2 - r_{ij}^2)^2 \cdot (R_{off}^2 - 3R_{on}^2 + 2r_{ij}^2)}{(R_{off}^2 - r_{ij}^2)^3}, & R_{on} < r_{ij} < R_{off}, \\ 0, & r_{ij} \geq R_{off}, \end{cases} \quad (9)$$

где U_{vdw} – энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий (потенциал Леннарда–Джонса); $W_{vdw}(r_{ij})$ – функция переключения с параметрами R_{on} и R_{off} ; σ_{ij} , ε_{ij} – параметры потенциала Леннарда–Джонса для пары частиц i и j . Они рассчитываются с использованием комбинационных правил: $\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \cdot \varepsilon_j}$ и $\sigma_{ij} = \frac{1}{2}(\sigma_i + \sigma_j)$. Эти параметры определяют глубину потенциальной ямы и положение ее минимума.

Взаимодействия между заряженными атомами описываются с помощью электростатического потенциала:

$$U_q = \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{\varepsilon \cdot r_{ij}} \cdot W_q(r_{ij}), \quad (10)$$

$$W_q(r_{ij}) = \begin{cases} \left(1 - \frac{r_{ij}}{R_q}\right)^2, & r_{ij} \leq R_q, \\ 0, & r_{ij} > R_q, \end{cases} \quad (11)$$

где U_q – электростатическая энергия; ε – диэлектрическая проницаемость среды; $W_q(r_{ij})$ – экранирующая функция с радиусом R_q ; r_{ij} – расстояние между частицами i и j , не связанными валентно. В данном случае $R_{off} = R_q = 10.5 \text{ \AA}$.

Для воды использовалась модель TIP3P, причем валентные связи и валентные углы не фиксировались, а задавались соответствующими потенциальными функциями.

Для поддержания постоянной температуры использовалась виртуальная столкновительная среда («столкновительный термостат») [Lemak, Balabaev, 1995; Lemak, Balabaev, 1996]. Столкновительный термостат моделируется посредством стохастических столкновений атомов исследуемой системы с виртуальными частицами массой m_0 и скоростью $v_{0,\alpha}$. Эти столкновения происходят по закону упругих шаров. Скорости виртуальных частиц выбираются из распределения Максвелла

$$P(\vec{v}_0) = \left(\frac{m_0}{2\pi kT}\right)^{\frac{3}{2}} \cdot \exp\left(-\frac{m_0 \vec{v}_0^2}{2kT}\right). \quad (12)$$

В уравнения движения добавляется дополнительная импульсная сила

$$m_i \frac{dv_{i,\alpha}}{dt} = -\frac{\partial U}{\partial r_{i,\alpha}} + \sum_k f_{ik,\alpha} \cdot \delta(t - t_{ik}). \quad (13)$$

Здесь t_{ik} – моменты столкновений, случайная величина, распределенная по Пуассону,

$$p(s) = \left(\frac{\lambda \cdot t}{s!}\right) \cdot \exp(-\lambda \cdot t), \quad (14)$$

$p(s)$ – вероятность того, что за промежуток времени от 0 до t произойдет s столкновений, где λ – частота столкновений.

Между моментами столкновений t_{ik} решаются классические уравнения Ньютона.

Средняя частота столкновений атомов с виртуальными частицами составляла 10 пс^{-1} , масса виртуальных частиц равнялась 1 а.е.м. Численное интегрирование уравнений движения осуществлялось с использованием скоростного алгоритма Верле [Allen, Tildesley, 1987]:

$$\begin{aligned} r(t+h) &= r(t) + v(t) \cdot h + \frac{1}{2} \cdot \frac{h^2}{m} \cdot F(t); \\ v(t+h) &= v(t) + \frac{h}{2m} [F(t) + F(t+h)], \end{aligned} \quad (15)$$

где h – шаг интегрирования, равный 0.001 пс.

Внешняя сила $F_i^{\text{внешняя}}$ при растяжении белков за концы с постоянной скоростью задавалась следующим образом:

$$F_i^{\text{внешняя}} = f_{spr} \cdot (x_0 - x), \quad (16)$$

Здесь f_{spr} – константа жесткости, равная 70 Н/м (это величина порядка жесткости валентных связей); $x_0(t) = x_0(0) \pm 0.5v \cdot t$ – средние положения x -координат каждого из концевых атомов белка в момент времени t , а $x(t)$ – их мгновенные положения; v – скорость растяжения.

2.3. Подготовка начальных данных

Стартовые координаты атомов белков брались из банка белковых структур. Белок помещался в параллелепипед, заполненный молекулами воды. Вода, которая стерически перекрывалась с атомами белка, удалялась. Таким образом были получены гидратированные белки с 1 772 молекулами воды в приповерхностном слое для белка L и с 1 844 молекулами воды для белка G. Вся система белок + вода помещалась в сфероцилиндр с непроницаемыми отталкивающими стенками достаточно больших размеров, чтобы не влиять на динамику белка и притягивающую к нему воду и в то же время не позволять испарившимся молекулам воды уходить на «бесконечность», возвращая их в область моделирования.

В начальный момент времени всем атомам стартовой конфигурации системы приписывались случайные скорости и проводилась релаксация системы при фиксированных положениях концевых атомов белка. Для каждого белка проводилась серия расчетов в независимых случайных столкновительных средах. Отрелаксированные таким образом в течение 50 пс системы были стартовыми для последующих вычислительных экспериментов, в которых использовалось дополнительное внешнее воздействие, приводящее к равномерному увеличению расстояния между концевыми атомами белков (в белке L концевыми были атомы 1N и 945Ca, а в белке G – атомы 1N и 839Ca).

Для каждого белка было проведено по 24 независимых вычислительных эксперимента, различающихся начальными данными (начальными координатами и скоростями атомов) и скоростями, с которыми изменялись расстояния между концевыми атомами. Было взято три значения скорости растяжения: $v = 0.125, 0.0625$ и 0.005 \AA/пс . Моделирование проводилось при $T = 350 \text{ К}$.

Моделирование растяжения проводилось до тех пор, пока в белках не оставалось ни одного аминокислотного остатка, имеющего спиральную либо β -структурную конформацию.

2.4. Вычисляемые характеристики

Был проведен анализ числа контактов и их изменения в процессе силового разворачивания белков между остатками, входящими в различные элементы вторичной структуры. При анализе приведенных ниже результатов считалось, что если какие-либо два атома, входящие в аминокислотные остатки, принадлежащие к различным элементам вторичной структуры, находятся на расстоянии $< 5 \text{ \AA}$, то эти аминокислотные остатки контактируют друг с другом. При расчете

контактов не учитывались контакты между двумя соседними по цепи аминокислотными остатками.

Вычислялась работа (A) первичного разрушения нативной пространственной структуры белка под действием внешней силы. Работа рассчитывалась соответственно как площадь под кривой зависимости силы от расстояния между концами белка.

3. Результаты, обсуждение

3.1. Механические свойства белков L и G

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

Полученные графики зависимости силы от расстояния между концами белков приведены на рис. 2. Исследование этих зависимостей показало, что все полученные траектории можно разделить на 3 группы: траектории, на которых появляется один (в 6 случаях для белка L и в 8 для белка G), два (12 – L, 13 – G) и три пика силы (6 – L, 3 – G). Причем два пика силы как для белка L, так и для белка G наблюдаются в половине случаев. Наличие нескольких пиков силы на траектории говорит о том, что в процессе такого механического разворачивания этих белков появляются промежуточные состояния.

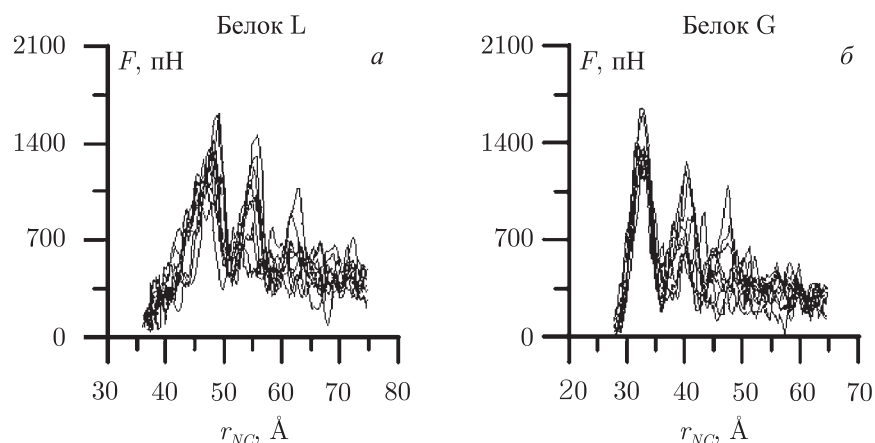


Рис. 2. Зависимость силы реакции F , действующей на концы белка, от времени: а) белок L; б) белок G. Для каждого белка приведено по 10 кривых при скорости растяжения $v = 0.0625 \text{ \AA/пс}$

Экспериментальные работы по растяжению этих белков в атомно-силовой микроскопии [Brockwell et al., 2005; Cao, Li, 2007; Cao, Li, 2008] и теоретические работы [Brockwell et al., 2005; Shimada, Shakhnovich, 2002], в которых используются грубые модели белков либо же растворитель учитывается неявно, говорят о том, что эти белки сворачиваются/разворачиваются по простому одностадийному механизму. Но сейчас уже появились экспериментальные работы [Waldauer et al., 2008] по разворачиванию белка L с помощью денатуранта, в которых указывается на то, что процесс разворачивания данного белка не описывается простой одностадийной моделью.

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

очередь приводит к увеличению высоты пиков. На рис. 3а приведена зависимость средней максимальной силы F_{\max} , которая возникает при таком механическом разворачивании белков, от величины скорости растяжения. Из графика видно, что при двух самых высоких скоростях оба белка характеризуются близкими значениями величины силы F_{\max} , различия становятся заметны только для наименьшей из использованных скоростей растяжения. Для того чтобы развернуть белок G, потребовалась большая сила, чем та, которая возникает при растяжении белка L. Из этого следует, что белок G более механически стабилен, чем белок L. В то же время изменения расстояния между концами белка, при которых наблюдается максимум силы, для белка L в два раза больше, чем для белка G, и работа, которую требуется совершить, чтобы развернуть эти белки на начальном этапе, для белка L в 1.5 раза больше, чем для белка G (рис. 3б).

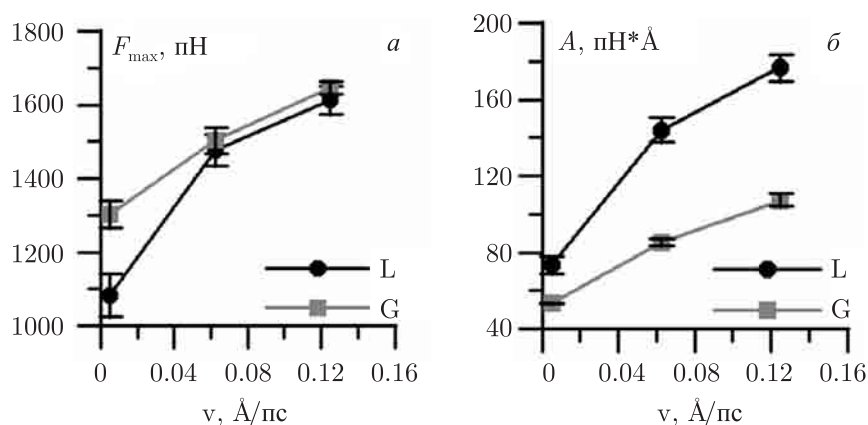


Рис. 3. Зависимости а) средней максимальной силы F_{\max} , возникающей при растяжении белков с постоянной скоростью, и б) работы A первичного разрушения белковой глобулы от величины скорости растяжения V

3.2. Пути механического разворачивания белков L и G

Анализ числа контактов между различными элементами вторичной структуры позволил выявить три возможных способа разворачивания белков L и G. Во всех случаях белки сначала разрываются на две структурные единицы. В первом случае этими структурными единицами являются [N-шпилька + α -спираль] и [C-шпилька], во втором – [N-шпилька] и [C-шпилька] (α -спираль не примыкает ни к одному из этих блоков) и в третьем – [N-шпилька] и [α -спираль + C-шпилька]. Причем первый способ наблюдается наиболее часто, а третий способ наблюдался в единичном случае (как для белка L, так и для белка G) только при самой маленькой скорости растяжения $0.005 \text{\AA}/\text{ps}$.

На рис. 4 приведена иллюстрация этих трёх способов разворачивания. На рис. 4а и 4б приведены зависимости числа контактов между N-концевой шпилькой и спиралью и C-концевой шпилькой и спиралью. Видно, что когда между спиралью и C-концевой шпилькой уже не остаётся контактов, между спиралью и N-концевой шпилькой они ещё имеются. Это соответствует тому, что сначала C-концевая шпилька отрывается от структуры, в которой N-шпилька и спираль ещё остаются связанными. На рис. 4в и 4г видно, как контакты между спиралью и этими концевыми шпильками начинают уменьшаться одновременно, из этого следует, что шпильки начинают одновременно удаляться друг от друга и спирали. На рис. 4д и 4е наблюдается способ разворачивания, противоположный первому. В то время как число контактов между N-концевой шпилькой и спиралью падает, контакты между C-шпилькой и спиралью продолжают удерживаться. Это указывает на то, что теперь N-концевая шпилька отрывается от структуры, в которой C-концевая шпилька и спираль ещё остаются связанными.

ные напряжения одинаковы. В то же время при малой скорости растяжения для разворачивания белка G требуется приложить большую силу по сравнению с белком L. Первичное разрушение нативной пространственной структуры белка G начинается при расстоянии между концами белка в два раза меньшем, чем у белка L. А величина затраченной при этом работы на первичное разрушение белка L в 1.5 раза больше, чем для белка G.

На пути механического разворачивания белков L и G появляются промежуточные состояния, которые не обнаруживались ранее в экспериментах по атомно-силовой микроскопии. Проведенные вычислительные эксперименты указывают на три различных способа (типа пути) разворачивания белков L и G. В каждом из этих путей разворачивания белковых глобул могут возникать промежуточные состояния.

Список литературы

- Paci E., Karplus M.* Unfolding Proteins by External Forces and Temperature: The Importance of Topology and Energetics // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 6521–6526.
- West D. K., Brockwell D. J., Olmsted P. D., Radford Sh. E., Paci E.* Mechanical Resistance of Proteins Explained Using Simple Molecular Models // Biophysical Journal. 2006. Vol. 90. P. 287–297.
- West D. K., Olmsted P. D., Paci E.* Free Energy for Protein Folding from Nonequilibrium Simulations Using the Jarzynski Equality // The Journal of Chemical Physics. 2006. Vol. 125, P. 204910–7.
- Wang J., Cieplak A., Kollman P. A.* How Well a Restrained Electrostatic Potential (RESP) Model Perform in Calculating Conformational Energies of Organic and Biological Molecules? // J. Comp. Chem. 2000. Vol. 21. P. 1049–1074.
- Lemak A. S., Balabaev N. K.* A Comparison Between Collisional Dynamics and Brownian Dynamics // Mol. Simul. 1995. Vol. 15. P. 223–231.
- Lemak A. S., Balabaev N. K.* Molecular Dynamics Simulation of Polymer Chain in Solution by Collisional Dynamics Method // J. Comp. Chem. 1996. Vol. 17. P. 1685–1695.
- Allen M. P., Tildesley D. J.* Computer Simulation of Liquids. Clarendon, Oxford, 1987.
- Brockwell D. J., Beddard G. S., Paci E., West D. K., Olmsted P. D., Smith D. A., Radford S. E.* Mechanically unfolding the small, topologically simple protein L // Biophys. J. 2005. Vol. 89, № 1. P. 506–519.
- Cao Y., Li H.* Polyprotein of GB1 is an ideal artificial elastomeric protein // Nature Mater. 2007. Vol. 6. P. 109–114.
- Cao Y., Li H.* How Do Chemical Denaturants Affect the Mechanical Folding and Unfolding of Proteins? // J. Mol. Biol. 2008. Vol. 375. P. 316–324.
- Shimada J., Shakhnovich E. I.* The Ensemble Folding Kinetics of Protein G from an All-Atom Monte Carlo Simulation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99. P. 11175–11180.
- Waldauer S. A., Bakajin O., Ball T., Chen Y., Decamp S. J., Kopka M., Jäger M., Singh V. R., Wedemeyer W. J., Weiss S., Yao S., Lapidus L. J.* Ruggedness in the folding landscape of protein L // HFSP Journal. 2008. Vol. 2. P. 388–395.