

УДК: 004.42+004.383+577.2

Фазовый переход от α -спиралей к β -листам в суперспиралях фибриллярных белков

А. А. Жмуров^{1,2,a}, А. Е. Алексеенко¹, В. А. Барсегов^{1,2}, О. Г. Кононова^{1,2},
Я. А. Холодов¹

¹Московский физико-технический институт,
Россия, 141700, г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9

²Университет Массачусетса в Лоуэлле,
One University Ave., Lowell, MA, 01854, США

E-mail: ^azhmurov@gmail.com

*Получено 1 августа 2013 г.,
после доработки 1 октября 2013 г.*

Изучен переход от α -структур к β -структурам под воздействием внешнего механического поля в молекуле фибрина, содержащей суперспираль, и разрешен ландшафт энергии. Проведено детальное теоретическое моделирование отдельных этапов процесса растяжения суперспирального фрагмента. На графиках зависимости силы (F) от растяжения молекулы (X) для тандема из двух симметричных суперспиралей фибрина (длина каждой ~ 17 нм) видны три режима механического поведения: (1) линейный (упругий) режим, в котором суперспираль ведет себя как энтропийная пружина ($F < 100 - 125$ пН и $X < 7 - 8$ нм), (2) вязкий (пластичный) режим, в котором сила сопротивления молекулы не меняется с увеличением растяжения ($F \approx 150$ пН и $X \approx 10 - 35$ нм) и (3) нелинейный режим зависимости F от X ($F > 175 - 200$ пН и $X > 40 - 50$ нм). В линейном режиме суперспираль раскручивается на угол в 2π радиан, но структурные изменения на уровне вторичной структуры не происходят. Вязкий режим сопровождается фазовым переходом от тройных α -спиралей к параллельным β -листам, в результате которого изменяется вторичная структура. Критическое растяжение α -спиралей составляет 0.25 нм на один виток, а характерное изменение энергии — 4.9 ккал/моль. Также были подсчитаны связанные с фазовым переходом изменения во внутренней энергии Δu , энтропии Δs и механической емкости c_f из расчета на один виток α -спирали. Подобное динамическое поведение α -спиралей при растяжении белковых филаментов может являться универсальным механизмом регуляции фибриллярных α -спиральных белков в ответ на внешнее силовое воздействие, возникающее в результате действия биологических сил.

Ключевые слова: фазовый переход от α -спиралей к β -листам, термодинамика перехода от α -спиралей к β -листам, фибриноген, нити фибрина, молекулярное моделирование, молекулярная динамика, графические процессоры

Работа выполнена при поддержке грантов Министерства образования и науки Российской Федерации № 14.A18.21.1239, № 14.A18.21.1871 и 14.A18.21.1520 и РФФИ в рамках научного проекта 12-04-31861.

Phase transition from α -helices to β -sheets in supercoils of fibrillar proteins

A. A. Zhmurov^{1,2}, A. E. Alekseenko¹, V. A. Barsegov^{1,2}, O. G. Kononova^{1,2},
Ya. A. Kholodov¹

¹Moscow Institute of Physics and Technology, 9 Institutskiy per., Dolgoprudnyi, 141700, Russia

²University of Massachusetts Lowell, One University Ave., Lowell, MA, 01854, USA

Abstract. — The transition from α -helices to β -strands under external mechanical force in fibrin molecule containing coiled-coils is studied and free energy landscape is resolved. The detailed theoretical modeling of each stage of coiled-coils fragment pulling process was performed. The plots of force (F) as a function of molecule expansion (X) for two symmetrical fibrin coiled-coils (each ~ 17 nm in length) show three distinct modes of mechanical behaviour: (1) linear (elastic) mode when coiled-coils behave like entropic springs ($F < 100$ – 125 pN and $X < 7$ – 8 nm), (2) viscous (plastic) mode when molecule resistance force does not increase with increase in elongation length ($F \approx 150$ pN and $X \approx 10$ – 35 nm) and (3) nonlinear mode ($F > 175$ – 200 pN and $X > 40$ – 50 nm). In linear mode the coiled-coils unwind at 2π radian angle, but no structural transition occurs. Viscous mode is characterized by the phase transition from the triple α -spirals to three-stranded parallel β -sheet. The critical tension of α -helices is 0.25 nm per turn, and the characteristic energy change is equal to 4.9 kcal/mol. Changes in internal energy Δu , entropy Δs and force capacity c_f per one helical turn for phase transition were also computed. The observed dynamic behavior of α -helices and phase transition from α -helices to β -sheets under tension might represent a universal mechanism of regulation of fibrillar protein structures subject to mechanical stresses due to biological forces.

Keywords: phase transition from α -helices to β -sheets, thermodynamics of transition from α -helices to β -sheets, molecular modeling, fibrinogen, fibrin fibers, Molecular Dynamics, GPU

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2013, vol. 5, no. 4, pp. 705–725 (Russian).

Работа выполнена при поддержке грантов Министерства образования и науки Российской Федерации № 14.A18.21.1239, № 14.A18.21.1871 и 14.A18.21.1520 и РФФИ в рамках научного проекта 12-04-31861.

Введение

Глобальные структурные переходы являются основой как нормальных функций, так и патологий белков и во многом определяют фолдинг белков, их активацию и деактивацию, агрегацию, белок-белковые взаимодействия и другие биофизические процессы. Изменения во вторичной структуре белков под внешним воздействием, такие как переходы от α -спиралей к β -листам, которые наблюдаются в целом ряде белковых систем, являются универсальным механизмом денатурации белков [Takahashi et al., 2000; Sethuraman et al., 2004; Sethuraman, Belfort, 2005; Buehler, Yung, 2009]. Экспериментально [Church et al., 1998; Kreplak et al., 2008; Kreplak et al., 2004; Fudge et al., 2003] и при помощи моделирования [Qin, Buehler, 2010; Daidone et al., 2004; Qin et al., 2009] было показано, что белки, состоящие из суперспиралей (англ. *coiled-coils*), формируют при растяжении β -структуры. Были исследованы такие белки как α -кератин [Kreplak et al., 2004] и филаменты белков на него похожих [Fudge et al., 2003], нити шерсти [Church et al., 1998], виментин [Qin et al., 2009], филаменты десмина [Kreplak et al., 2008]. В этих белках две α -спирали оборачиваются друг вокруг друга, формируя закрученную в левую сторону суперспираль [Cohen, Parry, 1990]. Фибрин — это еще один полимеризующийся белок, содержащий две длинные тройные суперспирали. Недавно было показано, что при внешнем воздействии этот белок может претерпевать фазовый переход от α -спиралей к β -листам, напрямую связанный с процессом его деформации, которая определяет его биологические функции [Litvinov et al., 2012; Purohit et al., 2011].

Полимеры фибрина образуются в крови в местах повреждений ткани. Эти структуры формируют основу останавливающего кровотока (гемостатического) сгустка или блокирующего поток крови в сосуде тромба (обтурационного сгустка). Фибрин образуется из фибриногена, димерного белка плазмы крови массой в 340 кДа. Фибриноген состоит из трех пар полипептидных цепей, называемых $A\alpha$, $B\beta$ и γ , связанных дисульфидными связями [Kollman et al., 2009; Medved, Weisel, 2009] (рис. 1). Две удаленные глобулярные части фибриногена связаны с центральной глобулярной частью двумя суперспиралями длиной в 17 нм, образованными тремя (а местами и четырьмя) α -спиралями. Формирование фибрина начинается с отщепления фибринопептидов A и B от N -терминальной части цепей $A\alpha$ и $B\beta$ фибриногена. При этом мономер фибриногена трансформируется в мономер фибрина, который обладает теми же структурными свойствами. Затем мономерный фибрин полимеризуется, образуя сеть нитей фибрина, в которой мономеры связываются как ковалентно, так и нековалентно [Weisel, 2005].

На молекулярном уровне ответ сгустка крови на внешнее механическое воздействие определяется денатурацией отдельных фрагментов молекулы фибрина [Brown et al., 2009; Purohit et al., 2011], но существует несколько гипотез о том, какие именно фрагменты денатурируют [Brown et al., 2009; Purohit et al., 2011; Guthold et al., 2007; Liu et al., 2010; Falvo et al., 2010]. В нашей предыдущей работе мы использовали эксперименты по денатурации единичной молекулы фибрина при помощи атомно-силовой микроскопии и компьютерное моделирование. Мы показали, что механическая денатурация фибриногена происходит посредством последовательного денатурирования фрагментов γ -узелка и обратимого растяжения и сжатия суперспиралей [Zhmigov et al., 2010; Жмуров и др., 2011]. Гипотеза о том, что при растяжении фибрина α -спирали переходят в β -листы, существует уже давно [Guthold et al., 2007]. В частности, в экспериментах с использованием красителя «Конго красный», который используется при поиске амилоидных фибрил, было показано наличие большой концентрации красителя на поверхности растянутых нитей фибрина, что свидетельствует о формировании новых структур, предположительно β -листов [Bailey et al., 1943]. Переход от α -структуры в β -структуру в фибрине также наблюдался в эксперименте по широкоугольному рассеиванию рентгеновского излучения на сжатых и на растянутых нитях фибрина [Litvinov et al., 2012].

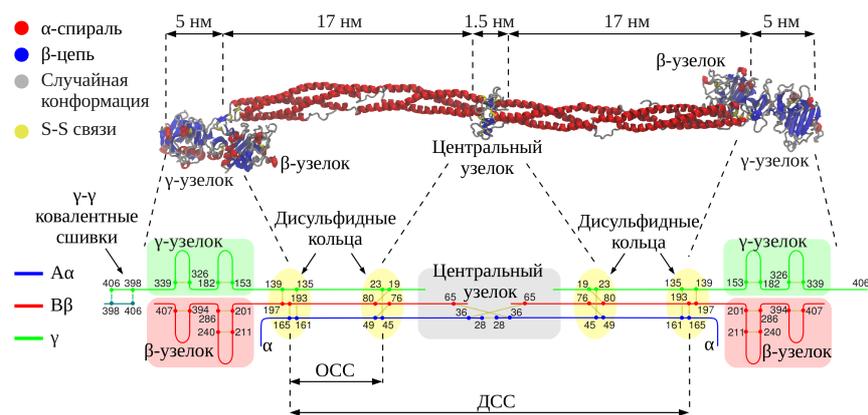


Рис. 1. Структура фибриногена человека в полноатомном разрешении (код структуры 3GNH в базе данных белковых структур PDB [Kollman et al., 2009]). На рисунке показаны глобулярные центральный, β - и γ -узелки. Также изображены размеры молекулы в нативном состоянии. Внизу приведена схема полипептидных цепей с ковалентными дисульфидными сшивками, на которой отмечены границы молекулярных систем «одионая суперспираль» (OSS) и «димер суперспиралей» (DSS)

В данной работе мы представляем результаты численного исследования и теоретического моделирования их механизма растяжения, используя составные части фибрина. Мы изучили две системы, содержащие суперспирали: (1) две симметричные суперспирали, связанные через центральный узелок (каждая суперспираль содержит аминокислоты $A\alpha 27-200$, $B\beta 58-197$, $\gamma 14-139$) и (2) отдельную (изолированную) суперспираль (аминокислоты $A\alpha 45-200$, $B\beta 76-197$, $\gamma 19-139$). Биомолекулярные симуляции предоставляют детальную картину структурных переходов в белках в атомарном разрешении [Lim et al., 2008; Zhmurov et al., 2011]. В силу большого размера молекулы фибрина молекулярное моделирование механических свойств фибрина остается сложной вычислительной задачей. В данной работе мы использовали молекулярное моделирование в неявном растворителе, а для того чтобы увеличить скорость расчета, мы применили аппаратное ускорение с использованием современных графических процессоров [Zhmurov et al., 2010; Жмуров и др., 2011; Zhmurov et al., 2011]. Мы показали, что растяжение суперспиралей фибрина определяется их последовательным раскручиванием и растяжением. Происходит переход от α -структуры к β -структуре, в результате чего формируются растянутые β -листы, состоящие из трех параллельных β -цепей. Описанные структурные переходы, возникающие в процессе растяжения фибрина, позволяют понять некоторые уникальные свойства нитей фибрина, включая их растяжимость, вязкоупругость и сопротивление механической нагрузке [Weisel, 2004]. Фазовый переход от α -структуры к β -структуре представляет собой механизм ответа суперспиралей на внешнее механическое воздействие. Предлагаемая в данной работе теоретическая модель является универсальным способом описания данного процесса для белков, содержащих как двойные, так и тройные суперспирали.

Результаты

Мы провели моделирование для одиночной суперспирали фибрина (далее OSS) и для димера суперспиралей, в котором две суперспирали соединены через центральный узелок (далее DSS) (рис. 1, подробнее исследуемые структуры описаны в разделе «Методы»). Для изучения зависимости силы реакции молекулы F от растяжения X в качестве внешнего воздействия была использована растущая со временем сила $f(t) = rft$. Для того чтобы получить зависимость усредненного растяжения молекулы $\langle X \rangle$ от внешней силы f , был использован протокол моделирования под действием постоянной силы $f = \text{const}$. В первом случае внешнее воздействие

соответствует экспериментам атомной силовой микроскопии, а получаемая зависимость может быть сравнена с соответствующей экспериментальной зависимостью. Во втором случае зависимость $\langle X(f) \rangle$ описывает различные режимы механического удлинения. Из-за большой сложности структуры исследуемых систем мы использовали молекулярное моделирование в неявном растворителе с применением моделей SASA (площадь доступная растворителю) и GB (обобщенная модель Борна) [Fraternali, van Gunsteren, 1996; Ferrara et al., 2002; Still et al., 1990; Dominy, Brooks, 1999] (см. раздел «Методы»).

Денатурация димера суперспиралей

Мы провели моделирование части фибрина, содержащей две суперспирали и центральный узелок (фрагмент ДСС). В этой системе отсутствовали глобулярные β - и γ -узелки (рис. 1). На графиках зависимости молекулярной силы от растяжения для данной системы можно выделить три различных режима механического ответа на внешнее воздействие (рис. 2). При небольшой внешней силе ($< 100 - 125$ пН) сила реакции молекулы (F) растет линейно с увеличением растяжения (X), то есть $F \sim X$ (рис. 2). В этом режиме суперспирали, начиная со свернутого состояния (структура 1 на рис. 2), раскручиваются на угол $\theta = 2\pi$ и ведут себя как упругая пружина (структура 2). В процессе раскручивания на наименее стабильных участках суперспиралей (аминокислоты $A\alpha 88 - 102$, $B\beta 133 - 142$ и $\gamma 66 - 84$) образуются как небольшие фрагменты β -цепей длиной в 4–6 аминокислот (так называемые зародыши β -структур, англ. *β -seeds*), так и небольшие неструктурированные участки. Постоянная жесткости для данного упругого режима, рассчитанная как производная зависимости силы (F) от растяжения (X), составляет $dF/dX \approx 33$ пН/нм.

Линейный режим продолжается вплоть до растяжения $X = 7-8$ нм, после чего сила реакции молекулы достигает значения в $F \approx 150$ пН и прекращает расти. Это соответствует режиму постоянной силы, который отражается как плато на графике зависимости силы от растяжения (рис. 3). В этом режиме суперспирали растягиваются от $\sim 7-8$ нм до $\sim 35-40$ нм (рис. 2), проявляя свойства пластичного материала. Одновременно с удлинением $A\alpha$, $B\beta$ и γ -цепи скручиваются обратно, поворачиваясь вокруг оси приложения внешней силы на угол -2π . В процессе закручивания три α -спирали трансформируются в три параллельные β -цепи, формирующие β -лист (рис. 2). В конечном итоге, вся α -структура переходит в β -структуру. Динамика вероятностей формирования α -структуры и β -структуры, то есть заселенности α -состояния и β -состояния, а также значения двугранных углов ϕ и ψ , которые характерны для α - и β -структур, показаны на рисунке 3, панели (A) и (B). Карта Рамачандрана двугранных углов ϕ и ψ , которые характеризуют вторичную структуру полипептидной цепи (рис. 3, панели (C) и (D)), демонстрирует переход из α -области ($-90^\circ < \phi < -30^\circ$ и $-60^\circ < \psi < 0^\circ$) в β -область ($-180^\circ < \phi < -60^\circ$ и $90^\circ < \psi < 180^\circ$) через промежуточную область $\alpha + \beta$, в которой присутствует оба типа вторичных структур ($-100^\circ < \phi < -75^\circ$ и $0^\circ < \psi < 90^\circ$). Мы также провели исследование динамики вторичной структуры при помощи алгоритма STRIDE [Frishman, Argos, 1995] и программы VMD [Humphrey et al., 1996]. В данном алгоритме учитываются как торсионные углы полипептидной цепи, так и геометрия водородных связей в молекуле. На рисунке 4 показана динамика элементов вторичных структур для аминокислот суперспиралей и промежуточные структуры молекулы. Небольшая часть α -спиралей остается не структурирована, что можно объяснить наличием внешнего воздействия в ходе моделирования. В целом результаты оценки композиции вторичных структур методом STRIDE соответствуют как результатам полученным при помощи карты Рамачандрана, так и оценкам через количество водородных связей (рис. 3).

В процессе α - β перехода наблюдается формирование экзотической структуры, в которой β -листы закручены в спираль (рис. 2, структура 4). Далее, эти структуры раскручиваются и денатурируют одновременно (для сравнения — структуры 4 и 5 на рис. 2). Раскручивание и денатура-

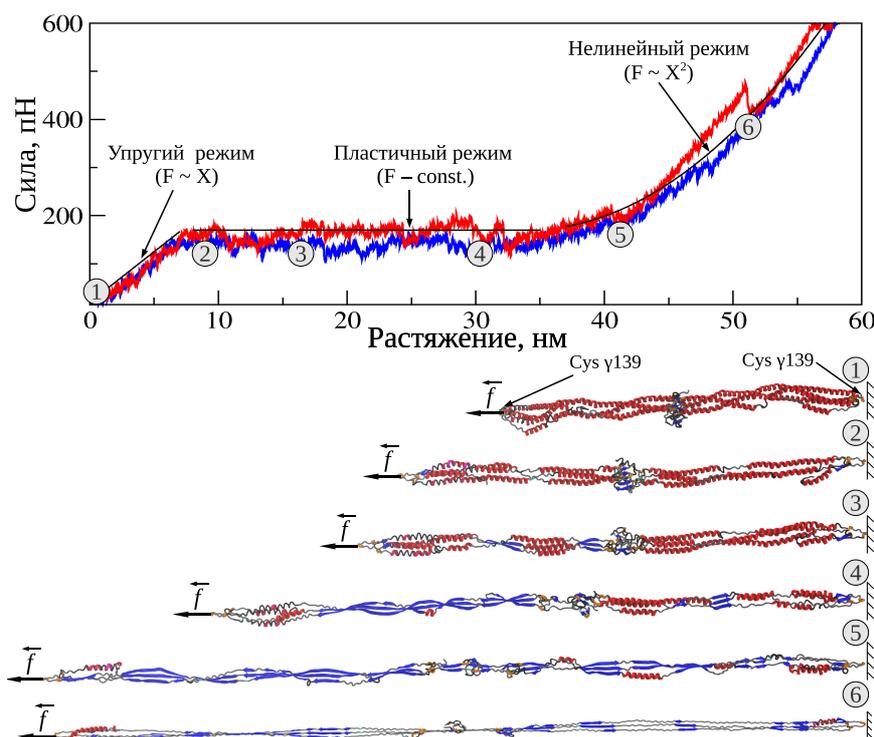


Рис. 2. Графики зависимости силы от растяжения для системы ДСС (синяя и красная линии), полученные при моделировании с нарастающей силой $f(t) = r_f t$. Внешняя сила прилагалась к аминокислоте Cys139 в направлении вектора, соединяющего концы молекулы (структура 1). При этом симметричная аминокислота Cys139 была зафиксирована. Кроме структуры нативного состояния (структура 1) показаны переходные конформации (структуры 2–5) и полностью растянутая конформация (структура 6)

рация начинает происходить в центральной части спиралей, где участвуют $\sim 90\%$ аминокислот в цепях $A\alpha$, $B\beta$ и γ (структура 3 на рис. 2). Из-за присутствия флуктуаций в натяжении в некоторых местах даже формируются π -спирали и 3_{10} -спирали. При растяжении на $X \approx 40$ нм почти вся α -структура переходит в β -структуру (структура 5 на рис. 2). Анализ энергии показал, что при раскручивании на угол 2π (закручивании на угол -2π) в линейном режиме рассчитываемая при моделировании внутренняя энергия системы не меняется. Следовательно, раскручивание (закручивание) молекулы соответствует энтропийному вкладу в энергию молекулярного растяжения (сжатия).

При растяжении молекулы на 35–40 нм сила F начинает снова расти, что соответствует началу нелинейного режима (рис. 2). В этом режиме растяжение суперспиралей от $X \approx 35$ –40 нм до $X \approx 55$ –60 нм соответствует параболическому росту силы, то есть $F \sim X^2$ (структура 6 на рис. 2), растягивающей углы между ковалентными связями, что приводит к выпрямлению полипептидного скелета молекулы. Это отражается в резком росте силы от 400 пН до 700 пН при сравнительно небольшом растяжении молекулы от 50 нм до 60 нм (рис. 2). Угол раскручивания вокруг оси направления внешней силы, при этом, близок к нулю, так как молекула уже полностью растянута (структура 6 на рис. 2). Небольшой скачок силы F при растяжении $X \approx 50$ –55 нм соответствует денатурации центрального узелка (структура 5 на рис. 2).

Механизм фазового перехода от α -структуры к β -структуре

Мы провели симуляции с постоянным внешним воздействием для одной суперспирали (система ОСС, см. раздел «Методы»). Для того чтобы получить среднее растяжение $\langle X \rangle$, для

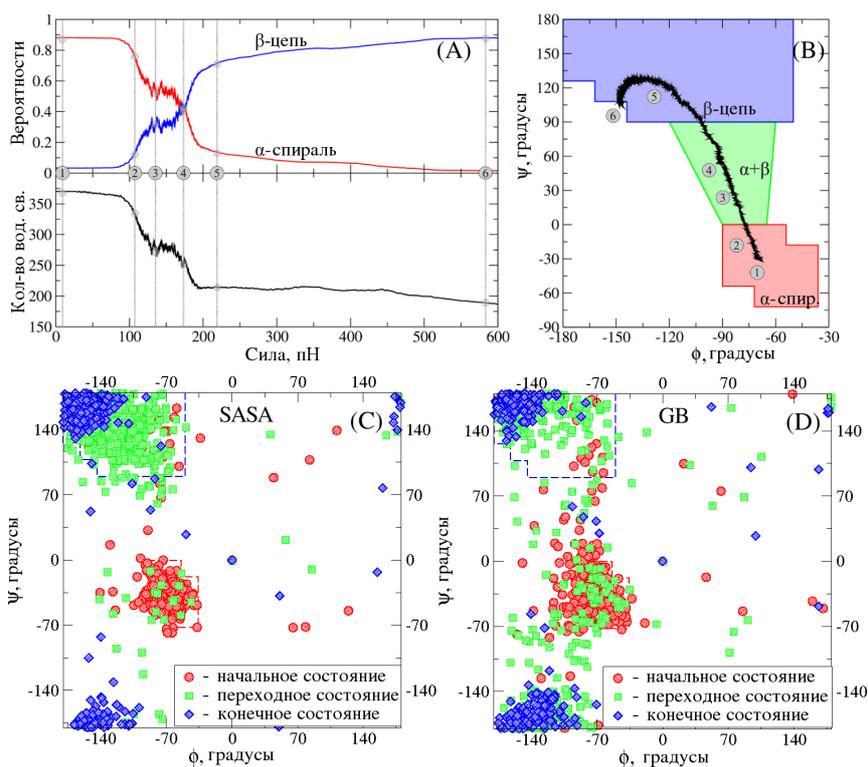


Рис. 3. Анализ вторичных структур при переходе от α -состояния в β -состояние в системе ОСС. Панель (А): вероятности формирования α -структуры и β -структуры (заселенности α -состояния и β -состояния) и количество водородных связей как функции силы. Панель (В): карта Рамачандрана для динамики среднего двугранного угла ϕ и ψ при увеличении силы $f(t) = r_f t$ со временем. Средние углы при малых силах находятся в области α -спиральных структур (показана красным цветом). При увеличении силы средний угол сначала перемещается в область смешанной структуры $\alpha + \beta$ (зеленый цвет), а затем перемещается в область β -структуры (синий). Структуры 1–6, пронумерованные на панелях (А) и (В), также показаны на рисунке 2. Панели (С) и (D): карта Рамачандрана для двугранных углов полипептидной цепи ϕ и ψ для двух моделей неявного растворителя: площадь доступная растворителю (SASA) и обобщенная модель Борна (GB)

каждого значения силы f мы провели пять симуляций и усреднили конечное растяжение. График зависимости $\langle X \rangle$ от f имеет сигмоидальный вид (рис. 5). До ~ 100 пН и после ~ 200 пН молекула растягивается слабо (от 1 до 3 нм и от 18 до 21 нм соответственно). В интервале 100–200 пН молекула ОСС, напротив, растягивается очень сильно — на 15 нм: от ~ 3 до ~ 18 нм (рис 5). Так же как и при моделировании ДСС (рис. 2), в диапазоне сил от 100 до 200 пН суперспирали ОСС раскручиваются и трансформируются в β -листы (рис. 2). Режим малой силы (< 100 пН) и режим большой силы (> 200 пН) соответствуют почти полностью α -спиральной структуре и β -листам соответственно. В переходном режиме ($100 < f < 200$ пН) присутствуют оба элемента вторичной структуры. С увеличением силы процент α -спиралей уменьшается, а процент β -листов увеличивается (рис. 3А).

Режим малой силы, переходный режим и режим большой силы, наблюдаемые в моделировании с постоянной внешней силой для ОСС ($f = \text{const}$, рис. 5), соответствуют линейному, пластичному и параболическому режимам механической денатурации, наблюдаемым в симуляциях с увеличивающимся внешним воздействием для ДСС ($f(t) = r_f t$, рис. 2). Мы проанализировали вероятности обнаружения α -спиралей ($p_\alpha(f)$) и β -листов ($p_\beta(f)$) как функцию от внешней силы (рис. 3А). При малой внешней силе 90 % ДСС (ОСС) — α -спирали, а процент β -листов равен ну-

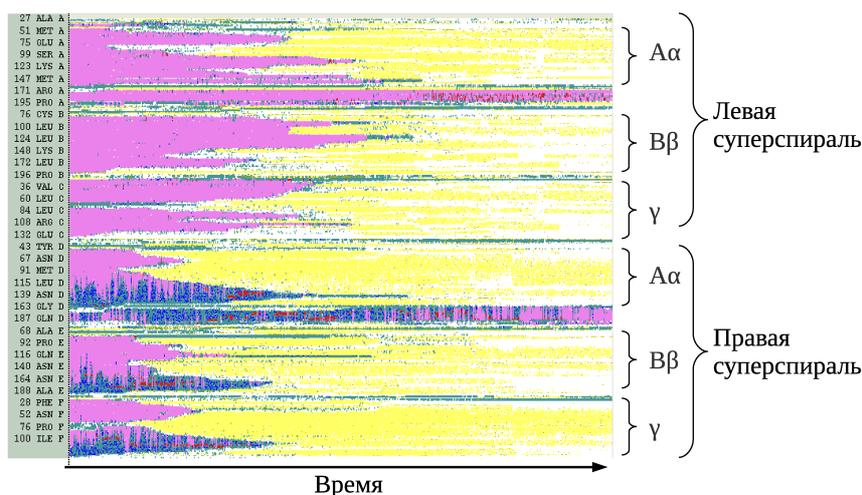


Рис. 4. Переход суперспирали фибрина из α -состояния в β -состояние. Временная шкала динамики вторичной структуры белка, сгенерированная с помощью программного пакета Visual Molecular Dynamics (VMD), описывает изменение элементов вторичной структуры для каждой аминокислоты в тройной суперспирали фибрина (вертикальная ось) как функцию от времени (горизонтальная ось). Обозначения «Левая суперспираль» и «Правая суперспираль» соответствуют симметричным левой и правой половинам суперспирали фибрина

лю (рис. 3А). Таким образом, в нативном состоянии $\sim 10\%$ суперспиралей не структурированы. При $f > 200\text{--}300$ пН процент α -спиралей падает до нуля, в то время как процент β -листов увеличивается до 90% . В полностью растянутом состоянии 10% системы также не структурировано. Несмотря на то, что количество водородных связей в ДСС уменьшается от 375 до 200 в интервале внешних сил от 0 до 300 пН (рис. 5А), их количество не достигает нуля даже при больших силах $f = 500\text{--}600$ пН. Это происходит потому, что β -листы стабилизируются молекулярными водородными связями, сшивающими параллельные β -цепи.

Модель с двумя состояниями: α -состоянием и β -состоянием

Мы моделировали зависимость растяжения от приложенной силы (рис. 5), используя модель с двумя состояниями, в которой полипептидная цепь разделяется на сегменты двух типов — α -состояние и β -состояние. Так как на малых силах наблюдается линейный режим ($F \sim X$), мы моделировали α -состояние как энтропийную пружину, в то время как β -состояние моделировалось при помощи червеобразной цепи (англ. *worm-like chain*), которая широко используется для моделирования механической денатурации белков и других биологических молекул [Isralewitz et al., 2001; Marszalek et al., 1999; Bustamante et al., 1994; Rief et al., 1998; Ahsan et al., 1998]. Приложение внешней механической силы вызывает удлинение молекулы как в α -состоянии, так и в β -состоянии и понижает энергетический барьер перехода от α -состояния в β -состояние. Схематичный профиль энергии изображен на рисунке 6.

Полное растяжение молекулы может быть описана функцией состояния, вид которой приведен на рисунке 5:

$$X(f) = p_{\alpha}(f)y_{\alpha}(f)L_{\alpha} + p_{\beta}(f)y_{\beta}(f)L_{\beta}, \quad (1)$$

что представляет собой суперпозицию растяжений в α -состоянии и в β -состоянии. В уравнении (1) p_{α} и p_{β} есть популяции α -состояния и β -состояния, которые зависят от приложенной силы (f), y_{α} и y_{β} — это относительные растяжения α -структуры и β -структуры, а L_{α} и L_{β} являются

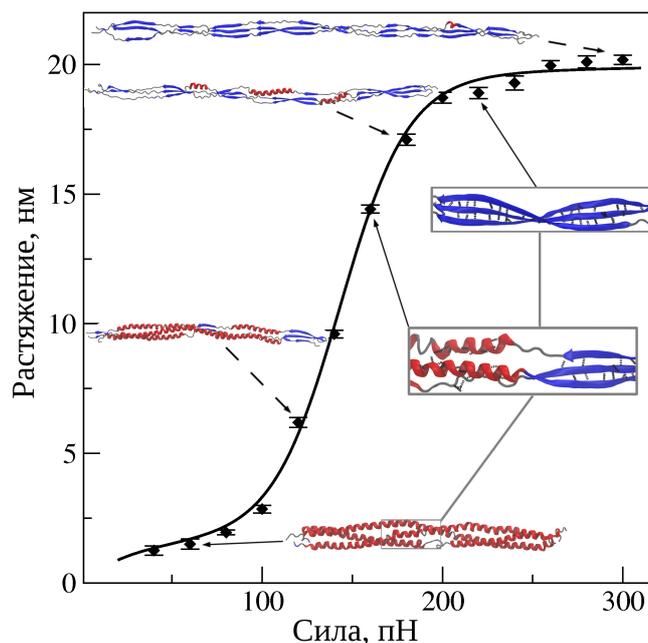


Рис. 5. Переход от α -структуры в β -структуру в суперспиралях фибрина (система ОСС), которая отражена в сигмоидальной форме графика зависимости среднего молекулярного растяжения $\langle X \rangle$ от значения постоянной силы f . Теоретическая кривая (черная линия, уравнение 1), приближает значения, полученные в результате численного моделирования. Структуры показаны для α -состояния (стабильное при $f < 100$ пН), β -состояния (стабильное при $f > 200$ пН) и переходного состояния со смешанной $\alpha + \beta$ -структурой ($f = 100$ – 200 пН). Справа показаны увеличенные структуры с водородными связями, отмеченными пунктирными линиями. В α -состоянии водородные связи в основном внутримолекулярные (т. е. между аминокислотами одной полипептидной цепи), в то время как в β -состоянии водородные связи межмолекулярные (т. е. между аминокислотами разных цепей)

полными растяжениями для α -состояния и β -состояния. Система в α -состоянии моделировалась как энтропийная пружина, для которой функция энергии имеет вид

$$E_{\alpha} = \frac{1}{2} k_{\alpha} X_{\alpha}^2, \quad (2)$$

где k_{α} — константа упругости пружины для α -суперспирали, $X_{\alpha} = f/k_{\alpha}$ — растяжение. Система в β -состоянии моделировалась при помощи червеобразной цепи [Bustamante et al., 1994; Rief et al., 1998], которая описывается следующей функцией энергии:

$$E_{\beta} = \frac{3k_B T}{2l_{\beta}} \int \left[\frac{\partial u(s)}{\partial s} \right]^2 ds, \quad (3)$$

где интегрирование проводится по всей длине цепи, $u(s)$ — касательный к цепи вектор в заданной точке, l_{β} — персистентная длина цепи, k_B — константа Больцмана, а T — температура. При $f = 0$ система находится в основном состоянии — α -состоянии, которое более стабильное по сравнению с β -состоянием (рис. 6). Тем не менее приложение внешней силы растягивает молекулу, что приводит к ее растяжению в α -состоянии:

$$y_{\alpha}(f) = \frac{X_{\alpha}(f)}{L_{\alpha}} = \frac{f}{k_{\alpha} L_{\alpha}}. \quad (4)$$

Также под воздействием внешней силы разность энергии между α - и β -состояниями уменьшается на $f z_{\alpha\beta}$, то есть

$$\epsilon(f) = \epsilon_0 - f z_{\alpha\beta}, \quad (5)$$

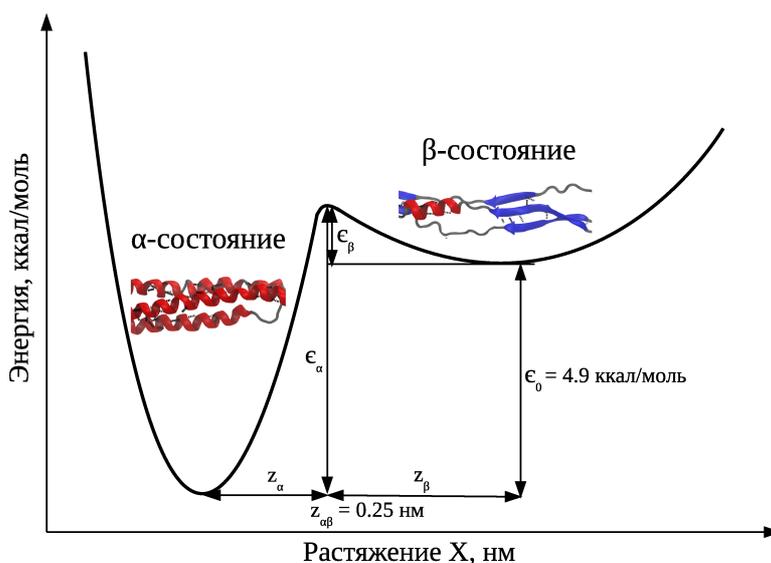


Рис. 6. Схематичный профиль энергии для фазового перехода суперспирали фибрина из α -состояния в β -состояние. Разница в энергии между двумя состояниями задается $\epsilon_0 = 4.9$ ккал/моль, а $z_{\alpha\beta} = 0.25$ нм — это разница между минимумами для α -состояния и β -состояния соответственно. Также ϵ_α и ϵ_β обозначают высоту барьера энергии для перехода из α -состояния в β -состояние и наоборот, а z_α и z_β — это расстояния от минимума энергий в α -состоянии до максимума энергии (энергетического барьера) и от минимума энергии в β -состоянии до того же энергетического барьера

где ϵ_0 — это разница в энергии между β -состоянием и α -состоянием в отсутствие приложенной силы, а $z_{\alpha\beta}$ — расстояние от минимума энергии для α -состояния до минимума энергии для β -состояния (см. рис. 6). Очевидно, что при увеличении внешней механической силы расстояние между уровнями энергии уменьшается на величину $fz_{\alpha\beta}$. Таким образом, при достаточно большой внешней силе, когда $\epsilon(f) \sim k_B T$, происходит фазовый переход от α -состояния в β -состояние.

В данной работе мы предполагаем, что для каждого значения приложенной силы система успевает достигнуть нового термодинамического равновесия. Тогда отношение вероятности нахождения системы в α -состоянии (p_α) к вероятности нахождения в β -состоянии (p_β), задается через фактор Больцмана, который принимает следующий вид:

$$\frac{p_\beta}{p_\alpha} = \exp\left[-\frac{\epsilon(f)}{k_B T}\right]. \quad (6)$$

Выводы уравнений (6) для фактора Больцмана и (5) для зависимости разницы энергии от приложенной силы представлены в приложении. Также мы ставим в соответствие нулевое значение энергии со значением энергии в α -состоянии. Принимая во внимание, что $p_\alpha + p_\beta = 1$ есть полная вероятность, можно получить конечные формулы для $p_\alpha(f)$ и $p_\beta(f)$. В β -состоянии молекула также может растягиваться. Согласно модели червеобразной цепи, относительное растяжение в β -состоянии под действием механической силы f задается уравнением

$$\frac{fl_\beta}{k_B T} = \frac{1}{4} \frac{1}{(1 - y_\beta)^2} - \frac{1}{4} + y_\beta. \quad (7)$$

Данное уравнение (7) является кубическим уравнением относительно y_β . Решая его для y_β , мы получаем три корня, два из которых комплексно сопряженные и один вещественный. Нас

интересует вещественное решение y_β , которое имеет вид [Ahsan et al., 1998]

$$y_\beta = \frac{X_\beta}{L_\beta} = 1 - \left(\sqrt[3]{\chi(\tau)} + \left[\frac{4}{3}\tau - 1 \right] \sqrt[3]{\frac{1}{\chi(\tau)}} \right)^{-1}, \quad (8)$$

где функция $\chi(\tau)$ зависит от параметра $\tau = fl_\beta/k_B T$ как:

$$\chi(\tau) = 2 + \sqrt{4 - ((4/3)\tau - 1)^3}. \quad (9)$$

Мы подобрали параметры для данной модели так, чтобы теоретический график зависимости $X(f)$ (ур. 1) хорошо совпадал с результатами численного эксперимента на всем диапазоне силы для системы ОСС (рис. 5). Для α -состояния мы получили постоянную упругости $k_\alpha = 35.1$ пН/нм и максимальное растяжение $L_\alpha = 4.4$ нм. Для β -состояния наилучшее совпадение с численным экспериментом получилось для $l_\beta = 1.5$ нм и максимального растяжения (контурной длины) $L_\beta = 19.7$ нм. Расстояние между α -состоянием и β -состоянием на ландшафте энергии $z_{\alpha\beta} = 0.25$ нм, а разность энергии между этими двумя состояниями в отсутствие силы $\epsilon_0 = 4.9$ ккал/моль на один виток спирали (рис. 6).

Термодинамические функции для фазового перехода из α -состояния в β -состояние

Если мы знаем явный вид статистической суммы для одного сегмента, то тогда мы можем описать термодинамику всего фазового перехода. Выражение для статистической суммы, которая зависит от внешней механической силы (f), для одного сегмента спирали имеет следующий вид:

$$q(f) = 1 + \exp \left[-\frac{\epsilon_0 - fz_{\alpha\beta}}{k_B T} \right]. \quad (10)$$

В нашем подходе мы предполагаем, что мы имеем N независимых сегментов, каждый из которых разворачивается независимо. Значит, статистическая сумма для α -суперспирали, состоящей из N независимых сегментов, задается уравнением

$$Q(f) = q(f)^N = \left(1 + \exp \left[-\frac{\epsilon_0 - fz_{\alpha\beta}}{k_B T} \right] \right)^N. \quad (11)$$

Таким образом, используя уравнения (10) и (11), мы можем вывести выражения для термодинамических функций, характеризующих процесс фазового перехода системы из α -состояния в β -состояние. В данной работе мы описываем изменение внутренней энергии $\Delta U(f) = N\Delta u(f)$, изменение в энтропии $\Delta S(f) = N\Delta s(f)$, а также механическую емкость $C_f = Nc_f$ (изменение внутренней энергии системы Δu при изменении механической нагрузки на 1 пН), где $\Delta u(f)$, $\Delta s(f)$ и c_f являются термодинамическими функциями в пересчете на один виток спирали. Можно показать, что $\Delta u(f)$, $\Delta s(f)$ и c_f задаются следующими уравнениями:

$$\Delta u(f) = -\frac{1}{q} \left(\frac{\partial q}{\partial \beta} \right) = \frac{(\epsilon_0 - fz_{\alpha\beta}) \exp \left[-\frac{\epsilon_0 - fz_{\alpha\beta}}{k_B T} \right]}{1 + \exp \left[-\frac{\epsilon_0 - fz_{\alpha\beta}}{k_B T} \right]}, \quad (12)$$

$$\Delta s(f) = k_B \ln q + k_B T \left(\frac{\partial \ln q}{\partial T} \right) = k_B \ln \left(1 + \exp \left[-\frac{\epsilon_0 - fz_{\alpha\beta}}{k_B T} \right] \right) + \frac{(\epsilon_0 - fz_{\alpha\beta}) \exp \left[-\frac{\epsilon_0 - fz_{\alpha\beta}}{k_B T} \right]}{T \left(1 + \exp \left[-\frac{\epsilon_0 - fz_{\alpha\beta}}{k_B T} \right] \right)}, \quad (13)$$

$$c_f = \frac{\partial \Delta u(f)}{\partial f} = - \frac{z_{\alpha\beta} \exp\left[-\frac{\epsilon_0 - fz_{\alpha\beta}}{k_B T}\right] \left(k_B T \left(1 + \exp\left[-\frac{\epsilon_0 - fz_{\alpha\beta}}{k_B T}\right]\right) - \epsilon_0 + fz_{\alpha\beta}\right)}{k_B T \left(1 + \exp\left[-\frac{\epsilon_0 - fz_{\alpha\beta}}{k_B T}\right]\right)^2}. \quad (14)$$

Поскольку в статистической сумме $q(f)$ энергия, связанная с переходом системы из α -состояния в β -состояние, $\epsilon(f)$ зависит от величины силы f , то термодинамические функции также будут содержать зависимость от f (5). Мы построили графики вероятностей, $p_\alpha(f)$ и $p_\beta(f)$, а также графики изменения функций внутренней энергии $\Delta u(f)$, энтропии $\Delta s(f)$ и механической емкости c_f в зависимости от силы f с использованием уравнений (5), (12)–(14). Для каждой функции мы варьировали значения разницы энергии между α -состоянием и β -состоянием ($\epsilon_0 = 3.0, 5.0, 7.0$ ккал/моль), зафиксировав значение $z_{\alpha\beta} = 0.25$ нм — расстояние от α -состояния до β -состояния (см. рис. 6), а также варьировали $z_{\alpha\beta} = 0.25, 0.40, 0.60$ нм, зафиксировав значение $\epsilon_0 = 5.0$ ккал/моль. На рисунке 7 представлены результаты: зависимость вероятности нахождения системы в α -состоянии и β -состоянии ($p_\alpha(f)$ и $p_\beta(f)$), а также изменение внутренней энергии ($\Delta u(f)$) от силы f . Зависимости изменения энтропии ($\Delta s(f)$) и механической емкости (c_f) от силы f представлены на рисунке 8.

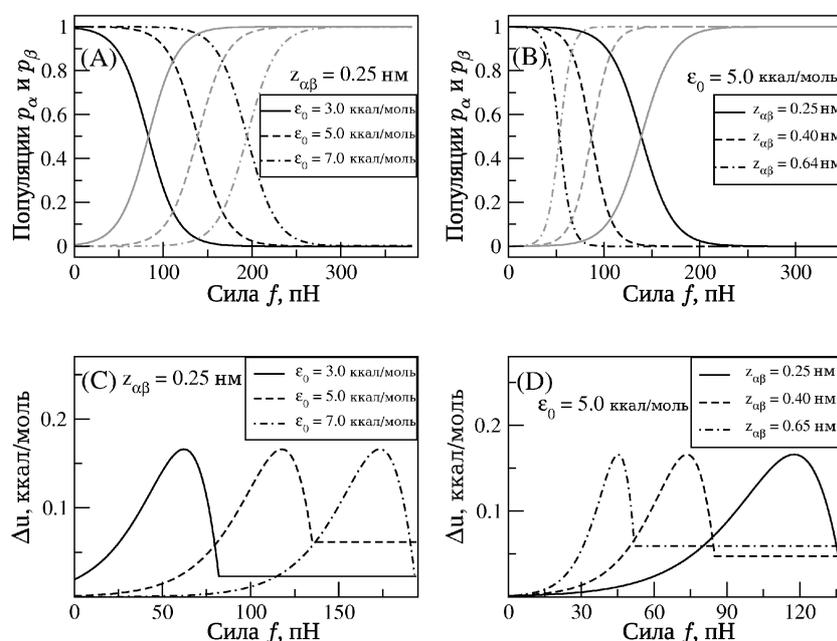


Рис. 7. Панели (А) и (В): графики изменения популяций α -состояния ($p_\alpha(f)$, черный) и β -состояния ($p_\beta(f)$, серый), в зависимости от величины приложенной механической силы f , рассчитанные на один сегмент α -спирали. Графики построены для фиксированного значения $z_{\alpha\beta} = 0.25$ нм и различных значений $\epsilon_0 = 3.0, 5.0, 7.0$ ккал/моль (панель (А)), а также для фиксированного параметра $\epsilon_0 = 5.0$ ккал/моль и различных значений параметра $z_{\alpha\beta} = 0.25, 0.40, 0.65$ нм (панель (В)). Панели (С) и (D): графики изменения функций внутренней энергии $\Delta u(f)$ при переходе из α -состояния в β -состояние в зависимости от силы f , рассчитанные для одного сегмента спирали (см. уравнение 12) при фиксированном значении $z_{\alpha\beta} = 0.25$ нм (панель (С)) и $\epsilon_0 = 5.0$ ккал/моль (панель (D))

Обсуждение результатов

В данной работе было проведено детальное изучение наномеханики суперспиралей фибрина методами молекулярного моделирования на атомарном уровне с применением графических процессоров, а также при помощи теоретических подходов. Для того чтобы определить роль суперспиралей в процессе растяжения фибрина, использовались две молекулярные системы —

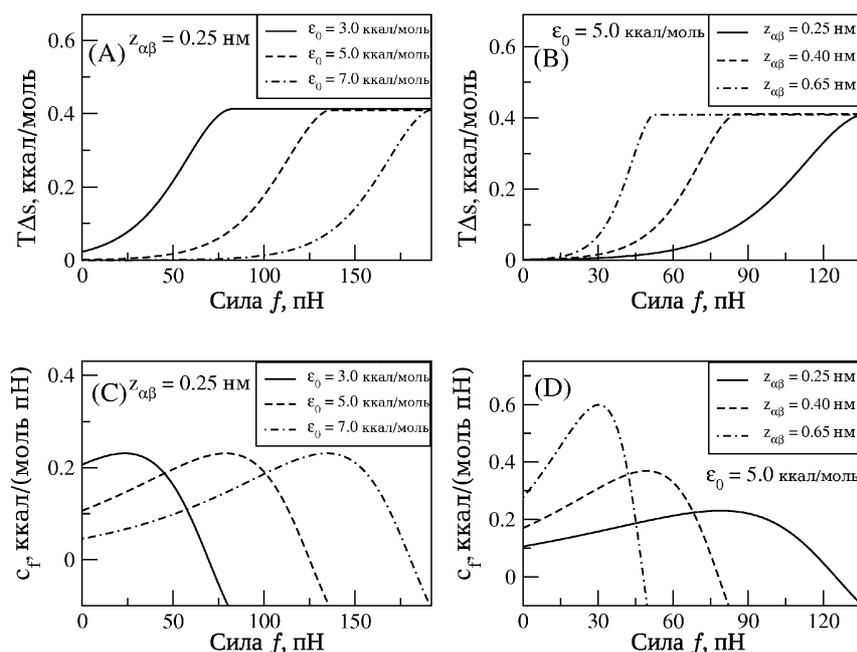


Рис. 8. Панели (А) и (В): графики изменения энтропии $\Delta s(f)$ для перехода из α -состояния в β -состояние как функции приложенной механической силы f , рассчитанные на один сегмент α -спирали. Графики построены для фиксированного значения $z_{\alpha\beta} = 0.25$ нм и различных значений $\epsilon_0 = 3.0, 5.0, 7.0$ ккал/моль (панель (А)), а также для фиксированного значения $\epsilon_0 = 5.0$ ккал/моль и различных значений параметра $z_{\alpha\beta} = 0.25, 0.40, 0.65$ нм (панель (В)). Панели (С) и (D): графики изменения механической емкости c_f в зависимости от силы f для перехода из α -состояния в β -состояние, рассчитанные для одного сегмента спирали при фиксированном значении $z_{\alpha\beta} = 0.25$ нм (панель (С)) и $\epsilon_0 = 5.0$ ккал/моль (панель (D))

димер суперспиралей (ДСС) и одиночная суперспираль (ОСС) фибрина. В качестве протоколов внешнего силового поля были использованы механическая тяга с постоянной силой (англ. *force-clamp*) и с растущей силой (англ. *force-ramp*). Из-за большого количества степеней свободы в изучаемых системах мы использовали моделирование в неявном растворителе. Для того чтобы исключить возможные артефакты моделирования, были использованы две различные модели описания водной среды — SASA (Solvent Accessible Surface Area) и GB (Generalized Born).

Молекулярное моделирование в неявном растворителе широко применяется для описания белков [Qin, Buehler, 2010; Qin et al., 2009]. Аппаратное ускорение на графическом процессоре (ГП) позволило нам использовать скорость движения зонда в 25 раз меньшую, чем та, которая использовалась Лимом и др. [Lim et al., 2008]. Мы прикладывали силу только к одному C_α -атому одной из аминокислот в дистальном дисульфидном кольце, а не к трем сразу (рис. 1). В результате в нашей работе молекула могла свободно поворачиваться вокруг оси приложения силы, что являлось составной частью механизма ее механического раскручивания и денатурации.

На графиках зависимости силы от растяжения для фрагмента фибрина, содержащего димер суперспирали (ДСС), отчетливо видны три режима (рис. 2). В линейном режиме система отвечает на внешнее воздействие упруго, в то время как в режиме постоянной силы молекула ведет себя как пластичный материал. Переход от упругого к пластичному режиму происходит при растяжении в 8–10 нм и при силе в 150 пН (рис. 2). Молекулярное растяжение продолжается в нелинейном режиме, в котором внешняя сила распрямляет углы между связями и двугранные углы. Нужно отметить, что похожая форма графика зависимости силы от растяжения наблюдалась в двойной суперспирали миозина, хотя режим постоянной силы возникал при ее значении в 30–40 пН [Schwaiger et al., 2002]. Согласно результатам, опубликованным нами ра-

нее [Zhmuov et al., 2011], при одновременном растяжении глобулярных доменов и суперспирального фрагмента фибрина (как это происходит при денатурации целой молекулы) максимумы силы, возникающие при денатурации глобулярных структур, скрывают плато денатурации суперспиралей.

Молекулярные механизмы трех различных режимов денатурации суперспиралей сильно различаются. В линейном (упругом режиме) растяжение суперспиралей происходит благодаря их раскручиванию вокруг оси приложения силы. При этом спирали растягиваются как единое целое. Внутренняя энергия при этом остается постоянной, а свободная энергия изменяется благодаря изменению энтропии системы. Поэтому в линейном режиме суперспирали растягиваются как жесткая энтропийная пружина. Нами было получено ранее то, что для системы ОСС, $T\Delta S \approx -90$ кДж/моль при полном растяжении спиралей [Zhmuov et al., 2011]. Этот результат хорошо согласуется с результатами данной работы. В режиме постоянной силы (пластичный режим) растяжение сопровождается изменением энтальпии системы. Для системы ДСС $\Delta H \approx 330$ кДж/моль, что сравнимо с изменением энтальпии при полном растяжении суперспиралей в $\Delta H = 285$ кДж/моль, полученным нами ранее [Zhmuov et al., 2011]. В пластичном режиме суперспирали могут сжиматься и закручиваться, а в нелинейном режиме спирали также могут сжиматься.

Широкий диапазон значений сил перехода от α -состояния к β -состоянию (100–200 пН, рис. 5) скорее всего говорит о том, что этот переход некооперативный, то есть α -сегменты преобразуются независимо друг от друга. Именно поэтому мы моделировали статистическую сумму как продукт статистических сумм для независимых сегментов (ур. 10, 11). Оценка постоянной упругости для α -состояния ($k_\alpha = 35.1$ пН/нм) близка к наклону графика зависимости силы от растяжения в 33 пН/нм (рис. 2), полученному из симуляций. Максимальное растяжение α -спиралей $L_\alpha = 4.4$ нм также близко к растяжению α -состояния в 3–4 нм, представленному на рисунке 5, а большая характеристическая длина молекулы в β -состоянии $l_\beta = 1.5$ нм (~3–4 аминокислоты) объясняется высокой жесткостью β -листов. Значения сил денатурации для систем ОСС и ДСС, содержащих тройные суперспирали, значительно выше соответствующих значений в ~50 пН, полученных для двойных суперспиралей миозина [Schwaiger et al., 2002]. Эта разница возникает из-за взаимодействий между тремя смежными α -спиралями, которые делает тройную суперспираль еще более жесткой.

Хотя расстояние между α - и β -состояниями на один виток спирали ($z_{\alpha\beta} = 0.25$ нм; рис. 6) близко к другим теоретическим оценкам (0.12 нм [Qin, Buehler, 2010]), оно мало по сравнению со значением этого параметра для глобулярного D-домена фибрина (~1 нм [Zhmuov et al., 2011]). Это говорит о том, что α -спирали легко преобразуются в β -цепи как только сила внешнего воздействия достигает величины, достаточной для изменения двугранных углов системы. Переход в β -состояние начинается при силе $f^* \approx 150$ пН (рис. 2), а характерная энергия для этого перехода $\epsilon_{\alpha\beta} \approx f^* z_{\alpha\beta} = 5.4$ ккал/моль (рис. 6) близка к значению энергии, разделяющей α -состояние и β -состояние в равновесии, $\epsilon_0 \approx 4.9$ ккал/моль (рис. 6). Ее можно оценить как сумму энергии разрушения водородной связи $N-H \dots O$ (~3 ккал/моль) [Gao, Kelly, 2009] и изменения энергии двугранных углов скелета цепи белка при переходе от α к β (~2 ккал/моль) [Pettitt, Karplus, 1988].

Механизм преобразования α -структуры в β -структуру в фибрине, описанный в данной работе, может объяснить ряд уникальных свойств полимеров фибрина, таких как его растяжимость, усиление сопротивления механической нагрузке, вязко-упругость и негативную сжимаемость [Weisel, 2004]. Согласно результатам, описанным в данной работе и полученным нами ранее [Zhmuov et al., 2011], денатурация γ -узелков происходит до или одновременно с переходом от α -состояния в β -состояние, но вклад растяжения суперспиралей в общее удлинение молекулы не зависит от порядка этих событий. Растяжение суперспиралей происходит за счет

перехода от α -спирали (0.15 нм на аминокислоту) к β -цепи (0.32–0.34 нм на аминокислоту). Среди всех глобулярных доменов фибрина первым денатурирует γ -узелок [Zhmurov et al., 2011] с длиной контура в 80 нм, что ведет к удлинению молекулы (45 нм) в ~ 2 раза (45 нм). Дополнительным механизмом при натяжении ≥ 1.2 раза может быть раскручивание/денатурация и переход от α -состояния в β -состояние суперспиральной части молекулы.

Мы также изучили термодинамические характеристики для фазового перехода из α -состояния в β -состояние, используя зависимость популяций α -состояния и β -состояния и внутренней энергии (рис. 7), а также энтропии и механической емкости (рис. 8) от приложенной силы f из расчета на один сегмент α -спирали. Мы видим, что популяция α -состояния p_α непрерывно уменьшается с увеличением силы, в то время как популяция β -состояния p_β растет (рис. 7) так, что $p_\alpha + p_\beta = 1$. Точка пересечения, $p_\alpha(f^*) = p_\beta(f^*) = 0.5$, соответствует характеристической силе f^* для фазового перехода. Для системы ОСС, когда $\epsilon_0 \approx 5.0$ ккал/моль и $z_{\alpha\beta} = 0.25$ нм (рис. 7), $f^* \approx 140$ пН. Эта величина совпадает со значением f , которое соответствует половине высоты на сигмоидальной кривой, представленной на рисунке 5, а также со значением силы из графика вероятностей, представленном на рисунке 3А. При увеличении ϵ_0 от 3.0 до 7.0 ккал/моль характеристическая сила растет от $f^* \approx 70$ пН до $f^* \approx 190$ пН. При этом изменения популяций α -состояния и β -состояния происходит при более высоких значениях силы, но скорость изменения популяций остается постоянной. Это объясняется тем, что при увеличении разницы между энергиями этих двух состояний требуется приложение большей силы для того, чтобы опустить β -состояние на шкале энергии ($\epsilon(f) = \epsilon_0 - fz_{\alpha\beta}$; см. рис. 6) и тем самым сделать фазовый переход более вероятным. При увеличении $z_{\alpha\beta}$ от 0.25 до 0.65 нм мы наблюдаем смещение характеристической силы в сторону меньших значений, то есть уменьшение от $f^* \approx 140$ пН до $f^* \approx 50$ пН, а также увеличение скорости изменения вероятности пребывания в α -состоянии и в β -состоянии (кривые популяций p_α и p_β становятся более крутыми). Это можно объяснить тем, что увеличение $z_{\alpha\beta}$ производит «сглаживание» крутизны барьера энергии для перехода от α -состояния в β -состояние, что приводит к тому, что фазовый переход происходит быстрее и при меньших значениях приложенной силы.

Графики изменения внутренней энергии Δu как функции приложенной силы (рис. 7) показывают, что Δu сначала растет, а после достижения максимума убывает. Эта закономерность наблюдается как при варьировании разницы энергии при нулевой силе (ϵ_0), так и при варьировании расстояния ($z_{\alpha\beta}$). В тот момент, когда Δu достигает максимума, линейный (упругий) режим растяжения α -спирали, в котором спираль растянута до своего критического значения, заканчивается, и начинается фазовый переход из α -состояния в β -состояние. Для значений параметров $\epsilon_0 \approx 5.0$ ккал/моль и $z_{\alpha\beta} = 0.25$ нм (рис. 7) этот переход начинается со значения силы в ~ 120 пН, что хорошо согласуется с результатами, представленными на рисунке 5. Поскольку Δu описывает непосредственно сам процесс фазового перехода, после достижения своего максимума внутренняя энергия резко убывает и затем принимает постоянное значение, которое соответствует моменту завершения фазового перехода. Мы видим, что характеристические силы f^* принадлежат интервалам сил, когда Δu убывает. Например, для $\epsilon_0 \approx 5.0$ ккал/моль и $z_{\alpha\beta} = 0.25$ нм, $f^* \approx 120$ – 140 пН (см. рис. 7С). Когда ϵ_0 увеличивается от 3.0 до 7.0 ккал/моль, диапазон сил, в которых Δu достигает своего максимума, соответствует большим значениям f^* (рис. 7С). При увеличении $z_{\alpha\beta}$ от 0.25 до 0.65 нм диапазон сил смещается в сторону меньших значений f^* , а скорость изменения внутренней энергии увеличивается (рис. 7D). При этом, высота пика (максимума) Δu остается постоянной и составляет ~ 0.17 ккал/моль, то есть не зависит от ϵ_0 и $z_{\alpha\beta}$. Объяснение наблюдаемых результатов (рис. 7С и 7D) точно такое же, как и то, что приводилось нами выше (рис. 7А и 7В). Максимальное достигаемое значение внутренней энергии Δu^* соответствует механической работе, которую необходимо совершить для того чтобы система перешла из α -состояния в β -состояние. Поэтому Δu^* не зависит от расстояния между α -состоянием и β -состоянием на шкале энергии.

Графики изменения энтропии фазового перехода $T\Delta s$ в зависимости от приложенной силы f представлены на рисунке 8. При увеличении f от нуля до значения характеристической силы $f = f^*$, $T\Delta s$ непрерывно растет. При дальнейшем увеличении f ($f \geq f^*$), изменение энтропии принимает постоянное значение $T\Delta s \approx 0.4$ ккал/моль. Такое поведение кривой $T\Delta s$ наблюдается при всех значениях ϵ_0 и $z_{\alpha\beta}$. Для $\epsilon_0 \approx 5.0$ ккал/моль и $z_{\alpha\beta} = 0.25$ нм (рис. 8) $T\Delta s$ выходит на плато при $f^* \approx 120 - 130$ пН. Это хорошо согласуется с результатами, представленными на рисунке 2, а также на графиках заселенностей α -состояния и β -состояния и изменения внутренней энергии, представленных на рисунке 7. До момента фазового перехода в линейном (упругом) режиме ($f < 120$ пН, рис. 2) ключевую роль играет растяжение и раскручивание α -спирали (см. структуры 1 и 2 на рис. 2), что вносит вклад в увеличение энтропии системы. Затем система переходит в β -состояние ($f \geq 150$ пН), в котором все спирали уже раскручены (рис. 2, структуры 3 и 4). При этом ее энтропия остается постоянной ($\Delta s = \text{const}$). При варьировании ϵ_0 от 3.0 до 7.0 ккал/моль происходит постепенное увеличение значений характеристической силы от $f^* \approx 80$ пН до $f^* \approx 190$ пН, при этом профиль функции $T\Delta s$ не меняется, то есть скорость увеличения энтропии остается постоянной (рис. 8А). Тем не менее, увеличение расстояния $z_{\alpha\beta}$ от 0.25 до 0.65 нм сопровождается смещением характеристической силы f^* в сторону уменьшения ее значения, а также увеличением скорости изменения энтропии (крутизна наклона $T\Delta s$; см. рис. 8В). Значение $T\Delta s$ для фазового перехода (~ 0.4 ккал/моль) не меняется с изменением параметров ϵ_0 и $z_{\alpha\beta}$.

Также было изучено поведение механической емкости c_f (рис. 8), которая характеризует изменение внутренней энергии системы Δu при изменении механической нагрузки на 1 пН. Нужно отметить, что c_f можно рассматривать как механический аналог теплоемкости системы. Так как механическая емкость является производной функции $\Delta u(f)$ по силе и характеризует скорость изменения внутренней энергии (см. уравнение 14), то поведение c_f должно быть согласованно с поведением наклона касательной к функции Δu (рис. 7). На участке линейного режима, где Δu возрастает, $c_f > 0$, при этом c_f достигает максимума, а затем начинает убывать. В точке, где Δu принимает максимальное значение, то есть когда α -спирали растянуты до критического значения и начинают превращаться в β -листы, $c_f = 0$. Затем, Δu резко убывает и $c_f < 0$. Так же как и в случае изменения внутренней энергии Δu , описанное выше поведение функции c_f не зависит от параметров ϵ_0 и $z_{\alpha\beta}$. Мы видим, что увеличение ϵ_0 от 3.0 до 7.0 ккал/моль не отражается на профиле и максимальном значении c_f . При этом, изменение $z_{\alpha\beta}$ от 0.25 до 0.65 нм приводит к изменению профиля c_f , увеличению максимального значения c_f (соответственно скорости изменения внутренней энергии Δu) и уменьшению значения характеристической силы, при которой $c_f = 0$. Стоит отметить, что по аналогии с теплоемкостью, механическая емкость c_f представляет собой способность системы накапливать энергию в результате механического воздействия, используя при этом доступные степени свободы. В нашем случае механическая емкость c_f обусловлена способностью системы к одновременному удлинению и раскручиванию. Поэтому не удивительно, что значение c_f растет, например, при силе $f < 100$ пН для $\epsilon_0 = 5.0$ ккал/моль, $z_{\alpha\beta} = 0.25$ нм (рис. 8С). Таким образом, максимальное значение c_f , достигаемое при механическом воздействии на систему ($c_f \approx 0.25$ ккал/моль/пН; рис. 8С), соответствует критическому растяжению одного витка α -спирали. При последующем увеличении силы $f > 100$ пН значение c_f быстро падает до нуля, что, очевидно, происходит потому, что в этот момент система переходит из α -состояния в β -состояние.

Выводы

Наши результаты показывают, что причиной упругих и пластичных фибриллярных свойств являются как раскручивание, так и денатурация суперспиралей, так как эти структурные преобразования могут происходить как в упругом, так и в пластичном режиме (рис. 2). Также стоит

отметить, что переход от α -состояния в β -состояние ведет к формированию β -листов, которые, как известно, обладают способностью к формированию больших белковых агрегатов [Militello et al., 2004]. В результате такой агрегации площадь белка доступная растворителю может уменьшиться, а вода может вытесниться из структуры. Это может привести к уменьшению гидродинамического объема белка при увеличении растягивающей силы (негативная сжимаемость) [Brown et al., 2009; Purohit et al., 2011].

В завершение наши результаты выявили новые механические, структурные и термодинамические характеристики комплексной динамики поведения растянутых полимеров фибрина и прояснили роль суперспиралей в поведении других фибринообразующих белков. Динамический переход от эластичного режима к пластичному при механическом растяжении суперспиралей фибрина, ведущий к фазовому переходу от α -структуры к β -структуре, может быть механизмом, объясняющим уникальные физические свойства кровяного сгустка. Сила в 150 пН, которая необходима для этого структурного перехода, находится в пределах сил, испытываемых фибрином в физиологических условиях потока крови. Характерное плато на графике зависимости силы от растяжения может служить признаком возникновения перехода от α -структуры в β -структуру в фибринообразующих белках. Модель с двумя состояниями, использованная в данной работе для описания равновесного ландшафта энергии, а также термодинамические характеристики, такие как внутренняя энергия, энтропия и механическая емкость, могут служить теоретической основой описания подобных переходов в других системах, содержащих фибриллярные белковые структуры. Наблюдаемое раскручивание суперспиралей говорит о том, что ландшафт энергии многомерен, а механика денатурации должна описываться множеством взаимосвязанных координат реакции.

Методы

Структурные модели. В качестве основной структурной модели была использована кристаллографическая структура полной молекулы фибриногена человека (код базы данных белковых структур PDB: 3GHG [Kollman et al., 2009]). Мы использовали две укороченные системы — димер суперспиралей (ДСС) и одиночную суперспираль (ОСС) (рис. 1). В структуре ДСС использовались две симметричные тройки цепей $A\alpha$, $B\beta$ и γ , начиная с первых разрешенных в кристаллической структуре аминокислот и заканчивая последними разрешенными аминокислотами (цепи $A\alpha$), либо дистальными дисульфидными кольцами, граничащими с глобулярными D -доменами (цепи $B\beta$ и γ). ДСС состояла из 878 аминокислот (8870 атомов в силовом поле CHARMM19 или 14178 атомов в CHARMM22) и включала аминокислоты $A\alpha 27-200$, $B\beta 58-297$ и $\gamma 14-139$. Структура ОСС была получена исключением из структуры ДСС одной из суперспиралей и центрального узелка. Для лучшего сохранения структурной целостности данной системы, мы включили аминокислоты, начиная от центрального дисульфидного кольца и заканчивая дистальными дисульфидным кольцом. Таким образом, данная система состояла из аминокислот $A\alpha 44-200$, $B\beta 75-297$ и $\gamma 18-139$, что в сумме составляет 399 аминокислот (4054 атомов в силовом поле CHARMM19 и 6492 атомов в CHARMM22). Все структуры были минимизированы при помощи алгоритма градиентного спуска, нагреты до 300 К и оставлены в равновесии на 10 нс.

Модели неявного растворителя. Была использована стандартная функция потенциальной энергии V (силовое поле, англ. *force-field*) [MacKerell et al., 1998; MacKerell, 2004], состоящая из ковалентных (V_b) и нековалентных взаимодействий (V_{nb}): $V = V_b + V_{nb}$. Ковалентные взаимодействия описывались гармоническими вибрациями ковалентных связей (bond), углов между тремя атомами (angles) и двумя разными типами торсионных взаимодействий — для правильных (proper dihedrals) и неправильных торсионных углов (improper dihedrals):

$$V_b = \sum_{\text{bond}} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{angle}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dihedral}} K_\phi (1 - \cos(n\phi - \phi_0)) + \sum_{\text{improper}} K_\psi (\psi - \psi_0)^2, \quad (15)$$

где b и θ — расстояние между двумя атомами и угол между двумя смежными ковалентными связями, ϕ и ψ — торсионные углы поворота двух связей вокруг третьей, смежной к ним, а b_0 , θ_0 , ϕ_0 , и ψ_0 — равновесные значения этих величин, n — количество минимумов потенциала. Эти значения рассчитываются из текущего расположения атомов в системе (их пространственных координат). В уравнении (15) K_b , K_θ , K_ϕ — коэффициенты упругости вибрации ковалентных связей, угла между двумя смежными связями, правильных и неправильных торсионных вращений.

Нековалентная часть функции потенциальной энергии состоит из потенциала для электростатических взаимодействий и потенциала Леннарда-Джонса для взаимодействий Ван-дер-Ваальса:

$$V_{\text{nb}} = \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon r_{ij}} + \epsilon_{ij} \left(\left(\frac{R_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^6 \right), \quad (16)$$

где r_{ij} — расстояние между двумя взаимодействующими атомами, q_i и q_j — заряды атомов; ϵ и ϵ_0 — диэлектрическая проницаемость среды и диэлектрическая постоянная; $\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j}$ и $R_{ij}^{\text{min}} = (R_i^{\text{min}} + R_j^{\text{min}})/2$ — параметры Ван-дер-Ваальса для атомов i и j . В модели неявного растворителя SASA [Fraternali, van Gunsteren, 1996; Ferrara et al., 2002] энергия взаимодействия белка с растворителем описывалась как

$$V_{\text{solv}} = \sum_i \sigma_i A_i, \quad (17)$$

где A_i — зависящая от текущей конформации белка площадь атома i , доступная растворителю, а σ_i — энергетический коэффициент, описывающий гидрофобность (гидрофильность) атома i . В обобщенной модели Борна [Still et al., 1990; Dominy, Brooks, 1999] свободная энергия растворения описывается следующим соотношением:

$$V_{\text{solv}} = -\frac{k_c}{2} \left(\frac{1}{\epsilon_{\text{in}}} - \frac{1}{\epsilon_{\text{out}}} \right) \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{\sqrt{r_{ij}^2 + \alpha_i \alpha_j \exp\left(-\frac{r_{ij}^2}{\gamma \alpha_i \alpha_j}\right)}}, \quad (18)$$

где ϵ_{in} и ϵ_{out} — диэлектрические проницаемости белка и растворителя соответственно, α_i — зависящий от текущей конформации радиус Борна (радиус погружения) атома i , $\gamma = 4$ — постоянная модели. В данной работе мы использовали приближение Стилла для нахождения радиуса Борна атомов [Still et al., 1990; Dominy, Brooks, 1999].

Моделирование механической денатурации. Теоретическое моделирование проводилось с использованием молекулярной динамики в полноатомном разрешении в неявном растворителе (воде). Для улучшения производительности все вычислительные процедуры были реализованы на графическом процессоре. При использовании протокола с нарастающей механической силой система ДСС была зафиксирована с одной стороны, а прикладываемая с другой стороны сила была направлена по вектору, соединяющему концы молекулы $\vec{f}(t) = f(t)\vec{n}$. Зафиксирована была аминокислота $\gamma 139$, а внешнее воздействие прилагалось к симметричной аминокислоте из другой (симметричной) γ -цепи молекулы. Амплитуда силы была равна $f(t) = r_f t$, то есть линейно увеличивалась как $r_f = k_{\text{sp}} v_f$, где $k_{\text{sp}} = 100$ пН/нм — постоянная упругости, а $v_f = 10^5$ мкм/с — скорость движения зонда. Время выполнения одной симуляции составляло ~48 дней на ГП GeForce GTX 580, что соответствует 2 мкс биологического времени. При моделировании с постоянной внешней силой системы для ОСС направление силы также совпадало с вектором, соединяющим концы молекулы. Фиксировалась аминокислота $\gamma 19$, а сила прилагалась к аминокислоте $\gamma 139$. Для измерения среднего растяжения $\langle X \rangle$ и его флуктуаций $\langle \Delta X \rangle$ было сгенерировано по 5 траекторий длиной в 2 мкс для каждого значения силы.

Приложение: Вывод уравнений (5) и (6)

Можно показать, что заселенности β -состояния (p_β) и α -состояния (p_α) задаются следующими соотношениями: $p_\beta = k_{\alpha\beta}/(k_{\alpha\beta} + k_{\beta\alpha})$ и $p_\alpha = k_{\beta\alpha}/(k_{\alpha\beta} + k_{\beta\alpha})$, где $k_{\alpha\beta}$ и $k_{\beta\alpha}$ есть кинетические константы скорости перехода из α -состояния в β -состояние и из β -состояния в α -состояние, соответственно. Очевидно, что и $k_{\alpha\beta}$, и $k_{\beta\alpha}$ зависят от величины приложенной силы f . В данной работе мы предполагаем, что зависимость $k_{\alpha\beta}$ и $k_{\beta\alpha}$ от f может быть описана с помощью модели Белла [Barsegov, Thirumalai, 2005; Bell, 1978], то есть

$$k_{\alpha\beta}(f) = k_{\alpha\beta}^0 e^{fz_\alpha/k_B T} \quad \text{и} \quad k_{\beta\alpha}(f) = k_{\beta\alpha}^0 e^{-fz_\beta/k_B T}, \quad (19)$$

где $k_{\alpha\beta}^0 = A_\alpha \exp[-\epsilon_\alpha/k_B T]$ и $k_{\beta\alpha}^0 = A_\beta \exp[-\epsilon_\beta/k_B T]$ есть кинетические константы скорости в отсутствие приложенной механической силы. В уравнениях для $k_{\alpha\beta}^0$ и $k_{\beta\alpha}^0$, A_α и A_β — коэффициенты (частоты столкновений; англ. *attempt frequencies*), а ϵ_α и ϵ_β — высоты барьеров для перехода из α -состояния в β -состояние и из β -состояния в α -состояние, соответственно (рис. 6). Таким образом, уравнения (19) принимают в расчет то, что скорость реакции $\alpha \rightarrow \beta$ увеличивается, а скорость реакции $\beta \rightarrow \alpha$ уменьшается в результате приложения силы f . Это полностью соответствует нашим наблюдениям, согласно которым приложенное механическое воздействие дестабилизирует α -состояние и стабилизирует β -состояние.

Подставляя выражения для кинетических констант скорости $k_{\alpha\beta}(f)$ и $k_{\beta\alpha}(f)$ в уравнения для заселенностей α -состояния и β -состояния, p_α и p_β , и предполагая, что коэффициенты A_α и A_β приблизительно равны, то есть $A_\alpha \approx A_\beta$, мы получаем следующее выражение для фактора Больцмана:

$$\frac{p_\beta(f)}{p_\alpha(f)} = \frac{k_{\alpha\beta}(f)}{k_{\beta\alpha}(f)} = e^{-(\epsilon_\alpha - \epsilon_\beta)/k_B T} e^{f(z_\alpha + z_\beta)/k_B T}. \quad (20)$$

Принимая в расчет то, что $\epsilon_\alpha - \epsilon_\beta = \epsilon_0$ — это расстояние между уровнями энергии для α -состояния и β -состояния, и вводя обозначение $z_\alpha + z_\beta = z_{\alpha\beta}$ для расстояния между α -состоянием и β -состоянием, мы получаем уравнения (5) и (6) (рис. 6).

Список литературы

- Жмуров А. А., Барсегов В. А., Трифонов С. В. и др. Моделирование микромеханики биомолекул на графических процессорах с использованием динамики Ланжевена // *Мат. Модел.* — 2011. — Т. 23, № 10. — С. 133–156.
- Ahsan A., Rudnick J., Bruinsma R. Elasticity theory of the B-DNA to S-DNA transition // *Biophys. J.* — 1998. — Vol. 74. — P. 132–137.
- Bailey K., Astbury W. T., Rudall K. M. Fibrinogen and fibrin as members of the keratin-myosin group // *Nature.* — 1943. — Vol. 151, no. 3843. — P. 716–717.
- Barsegov V., Thirumalai D. Dynamics of unbinding of cell adhesion molecules: Transition from catch to slip bonds // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2005. — Vol. 102, no. 6. — P. 1835–1839.
- Bell G. L. Models for the specific adhesion of cells to cells // *Science.* — 1978. — Vol. 200, no. 4342. — P. 618–627.
- Brown A. E. X., Litvinov R. I., Discher D. E. et al. Multiscale Mechanics of Fibrin Polymer: Gel Stretching with Protein Unfolding and Loss of Water // *Science.* — 2009. — Vol. 325, no. 5941. — P. 741–744.
- Buehler M. J., Yung Y. C. Deformation and failure of protein materials in physiologically extreme conditions and disease // *Nat. Mater.* — 2009. — Vol. 8, no. 3. — P. 175–188.
- Bustamante C., Marko J. F., Siggia E. D., Smith S. Entropic elasticity of lambda-phage DNA // *Science.* — 1994. — Vol. 265, no. 5178. — P. 1599–1600.

- Church J. S., Corino G. L., Woodhead A. L. The effects of stretching on wool fibres as monitored by FT-Raman spectroscopy // *J. Mol. Struct.* — 1998. — Vol. 440, no. 1-3. — P. 15–23.
- Cohen C., Parry D. A. D. α -Helical coiled coils and bundles: How to design an α -helical protein // *Proteins.* — 1990. — Vol. 7, no. 1. — P. 1–15.
- Daidone I., Simona F., Roccatano D. et al. β -Hairpin conformation of fibrillogenic peptides: Structure and α - β transition mechanism revealed by molecular dynamics simulations // *Proteins.* — 2004. — Vol. 57, no. 1. — P. 198–204.
- Dominy B. N., Brooks III C. L. Development of a Generalized Born Model Parametrization for Proteins and Nucleic Acids // *J. Phys. Chem. B.* — 1999. — Vol. 103, no. 18. — P. 3765–3773.
- Falvo M. R., Gorkun O. V., Lord S. T. The molecular origins of the mechanical properties of fibrin // *Biophys. Chem.* — 2010. — Vol. 152, no. 1-3. — P. 15–20.
- Ferrara P., Apostolakis J., Caflisch A. Evaluation of a fast implicit solvent model for molecular dynamics simulations // *Proteins.* — 2002. — Vol. 46, no. 1. — P. 24–33.
- Fraternali F., van Gunsteren W. F. An Efficient Mean Solvation Force Model for Use in Molecular Dynamics Simulations of Proteins in Aqueous Solution // *J. Mol. Biol.* — 1996. — Vol. 256, no. 5. — P. 939–948.
- Frishman D., Argos P. Knowledge-based protein secondary structure assignment // *Proteins.* — 1995. — Vol. 23, no. 4. — P. 566–579.
- Fudge D. S., Gardner K. H., Forsyth V. T. et al. The Mechanical Properties of Hydrated Intermediate Filaments: Insights from Hagfish Slime Threads // *Biophys. J.* — 2003. — Vol. 85, no. 3. — P. 2015–2027.
- Gao J., Kelly J. Toward quantification of protein backbone–backbone hydrogen bonding energies: An energetic analysis of an amide-to-ester mutation in an α -helix within a protein // *Protein Sci.* — 2009. — Vol. 17, no. 6. — P. 1096–1101.
- Guthold M., Liu W., Sparks E. A. et al. A Comparison of the Mechanical and Structural Properties of Fibrin Fibers with Other Protein Fibers // *Cell Biochem. Biophys.* — 2007. — Vol. 49, no. 3. — P. 165–181.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics // *J. Molec. Graphics.* — 1996. — Vol. 14, no. 1. — P. 33–38.
- Isralewitz B., Gao M., Schulten K. Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins. // *Current opinion in structural biology.* — 2001. — April. — Vol. 11, no. 2. — P. 224–30.
- Kollman J. M., Pandi L., Sawaya M. R. et al. Crystal Structure of Human Fibrinogen // *Biochemistry.* — 2009. — Vol. 48, no. 18. — P. 3877–3886.
- Kreplak L., Doucet J., Dumas P., Briki F. New Aspects of the α -Helix to β -Sheet Transition in Stretched Hard α -Keratin Fibers // *Biophys. J.* — 2004. — Vol. 87, no. 1. — P. 640–647.
- Kreplak L., Herrmann H., Aebi U. Tensile Properties of Single Desmin Intermediate Filaments // *Biophys. J.* — 2008. — Vol. 94, no. 7. — P. 2790–2799.
- Lim B. B. C., Lee E. H., Sotomayor M., Schulten K. Molecular Basis of Fibrin Clot Elasticity // *Structure.* — 2008. — Vol. 16, no. 3. — P. 449–4596.
- Litvinov R. I., Faizullin D. A., Zuev Y. F., Weisel J. W. The α -helix to β -sheet transition in stretched and compressed hydrated fibrin clots. // *Biophysical journal.* — 2012. — September. — Vol. 103, no. 5. — P. 1020–7.
- Liu W., Carlisle C. R., Sparks E. A., Guthold M. The mechanical properties of single fibrin fibers // *J. Thromb. Haemost.* — 2010. — Vol. 8, no. 5. — P. 1030–1036.
- MacKerell Jr. A. D., Bashford D., Bellott M. et al. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins // *J. Phys. Chem. B.* — 1998. — Vol. 102, no. 18. — P. 3586–3616.

- MacKerell A. D. Empirical force fields for biological macromolecules: Overview and issues // *J. Comput. Chem.* — 2004. — Vol. 25, no. 13. — P. 1584–1604.
- Marszalek P. E., Lu H., Li H. et al. Mechanical unfolding intermediates in titin modules. // *Nature.* — 1999. — November. — Vol. 402, no. 6757. — P. 100–3.
- Medved L., Weisel J. W. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin // *J. Thromb. Haemost.* — 2009. — Vol. 7, no. 2. — P. 355–359.
- Militello V., Casarino C., Emanuele A. et al. Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering // *Biophys. Chem.* — 2004. — Vol. 107, no. 2. — P. 175–187.
- Pettitt B., Karplus M. Conformational free energy of hydration for the alanine dipeptide: thermodynamic analysis // *J. Phys. Chem.* — 1988. — Vol. 92, no. 13. — P. 3994–3997.
- Purohit P. K., Litvinov R. I., Brown A. E. et al. Protein unfolding accounts for the unusual mechanical behavior of fibrin networks // *Acta Biomaterialia.* — 2011. — Vol. 7, no. 6. — P. 2374–2383.
- Qin Z., Buehler M. J. Molecular Dynamics Simulation of the α -Helix to β -Sheet Transition in Coiled Protein Filaments: Evidence for a Critical Filament Length Scale // *Phys. Rev. Lett.* — 2010. — Vol. 104, no. 19. — P. 198304.
- Qin Z., Kreplak L., Buehler M. J. Hierarchical Structure Controls Nanomechanical Properties of Vimentin Intermediate Filaments // *PLoS ONE.* — 2009. — Vol. 10, no. 4. — P. e7294.
- Rief M., Fernandez J. M., Gaub H. E. Elastically Coupled Two-Level Systems as a Model for Biopolymer Extensibility // *Phys. Rev. Lett.* — 1998. — Vol. 81, no. 21. — P. 4764–4767.
- Schwaiger I., Sattler C., Hostetter D. R., Rief M. The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure // *Nat. Mater.* — 2002. — Vol. 1, no. 4. — P. 232–235.
- Sethuraman A., Belfort G. Protein Structural Perturbation and Aggregation on Homogeneous Surfaces // *Biophys. J.* — 2005. — Vol. 88, no. 2. — P. 1322–1333.
- Sethuraman A., Vedantham G., Imoto T. et al. Protein unfolding at interfaces: Slow dynamics of α -helix to β -sheet transition // *Proteins.* — 2004. — Vol. 56, no. 4. — P. 669–678.
- Still W. C., Tempczyk A., Hawley R. C., Hendrickson T. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics // *JACS.* — 1990. — Vol. 112, no. 16. — P. 6127–6129.
- Takahashi Y., Ueno A., Mihara H. Mutational analysis of designed peptides that undergo structural transition from α helix to β sheet and amyloid fibril formation // *Structure.* — 2000. — Vol. 8, no. 9. — P. 915–925.
- Weisel J. W. The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians // *Biophys. Chem.* — 2004. — Vol. 112, no. 2-3. — P. 267–276.
- Weisel J. W. Fibrinogen and Fibrin // *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers* / Parry D. A. D., Squire J. M. (ed.). — Academic Press, 2005. — Vol. 70 of *Advances in Protein Chemistry.* — P. 247–299.
- Zhmurov A., Brown A. E. X., Litvinov R. I. et al. Mechanism of fibrin(ogen) forced unfolding // *Structure.* — 2011. — Vol. 19, no. 11. — P. 1615–1624.
- Zhmurov A., Dima R. I., Kholodov Y., Barsegov V. SOP-GPU: Accelerating biomolecular simulations in the centisecond timescale using graphics processors // *Proteins.* — 2010. — Vol. 78, no. 14. — P. 2984–2999.
- Zhmurov A., Rybnikov K., Kholodov Y., Barsegov V. Generation of Random Numbers on Graphics Processors: Forced Indentation In Silico of the Bacteriophage HK97 // *J. Phys. Chem. B.* — 2011. — Vol. 115, no. 18. — P. 5278–5288.