

Петухов Михаил Геннадьевич

Молекулярные механизмы конформационной стабильности белков при высоких температурах

03.00.02 Биофизика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора
физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2009

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук “Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова РАН”

Научный консультант:

доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник
Орлов Юрий Николаевич

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук,
Маслов Владимир Григорьевич,

доктор физико-математических наук,
Тулуб Александр Александрович

доктор физико-математических наук, профессор,
член-корреспондент РАН,
Финкельштейн Алексей Витальевич

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук “Институт цитологии РАН”

Защита состоится _____ 10 декабря 2009 г., 14:00
дата, время

на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при ГОУ “Санкт-Петербургский государственный политехнический университет” по адресу:

195251, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д.5.,
Факультет медицинской физики и биоинженерии, ауд. 305

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ГОУ ВПО “Санкт-Петербургский государственный политехнический университет”

Автореферат разослан _____
дата

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат физико-математических
наук

Власова О.Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Конструирование промышленно важных ферментов имеющих высокую активность и термостабильность при заданных условиях среды (температура, рН, давление, ионная сила и т.д.), имеет большое практическое значение и способно прояснить многие вопросы, связанные с механизмами сворачивания белков в уникальную биологически активную конформацию. В представленной работе были исследованы молекулярные механизмы гидратации и конформационной стабильности белков, и на этой основе разработаны новые теоретические подходы к рациональному конструированию промышленно важных ферментов. Их эффективность была проверена на примере одного из самых широко используемых в биотехнологической промышленности ферментов - глюкоамилазы из гриба *Aspergillus awamori*.

Гидратация белков, а также другие физические взаимодействия, стабилизирующие их структуру, являются одними из наиболее активно исследуемых факторов, влияющих на сворачивание глобулярных белков в воде. К сожалению, имеющиеся в настоящее время методы моделирования гидратации белков не позволяют одновременно учитывать все основные физические взаимодействия белка с водой (водородные связи, электростатическая поляризация, ван-дер-ваальсовы и гидрофобные взаимодействия) в одной вычислительно эффективной модели. Кроме того, значительный вклад в конформационную стабильность белка вносят такие структуры, как водные мостики на поверхности белка. Полноатомные модели гидратации, хотя и учитывают все эти факторы, перегружены несущественными деталями, а также требуют использования долгих времён релаксации и термодинамического уравнивания самих водных боксов при любых значительных изменениях конформации белка. Все это делает такие модели практически неприменимыми, если необходимо исследовать значительную часть конформационного пространства белка. Относительно простые и вычислительно эффективные модели гидратации белков на основе расчета их поверхности, доступной растворителю (ПДР), наоборот, слишком схематичны и не способны учесть существенные детали основных физических взаимодействий и присутствие стабильных структур воды на поверхности белка, что снижает их точность и предсказательную силу при моделировании процессов динамики и сворачивания белка в нативную конформацию. В представленной работе мы разработали новую модель гидратации белков на основе расчета ПДР, учитывающую водородные связи белка с водой, влияние всех

возможных водных мостиков, электростатическую поляризацию воды, ван-дер-ваальсовы взаимодействия и потери энтропии молекул воды на поверхности белка.

Одной из актуальных проблем биофизики является конструирование коротких пептидов и белков, имеющих достаточную конформационную стабильность при заданных условиях окружающей среды. В работе исследованы причины высокой термостабильности семейства белков RecA из термофильных бактерий и показано, что повышенная стабильность элементов их вторичной структуры является необходимым условием высокой конформационной стабильности белков при высоких температурах. Теоретически и экспериментально исследованы основные факторы, влияющие на стабильность этих элементов вторичной структуры в пептидах и глобулярных белках. На этой основе впервые разработан метод глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей, входящих в α -спиральные конформации, позволяющий находить уникальные последовательности, имеющие максимально возможное количество взаимодействий, стабилизирующих α -спираль. Эффективность метода была проверена на примере коротких пептидов и на глюкоамилазе из гриба *Asp. awamori*.

Актуальность выбора именно этого фермента в качестве объекта исследования определяется тем, что он является центральным элементом широкомасштабного промышленного процесса производства биоэтанола и глюкозо-фруктозных сиропов из различного растительного сырья и отходов сельскохозяйственного производства

Цели и задачи исследования

Целью представленной работы были исследование причин термостабильности глобулярных белков и разработка на этой основе вычислительно эффективных методов для молекулярного моделирования и рационального конструирования термостабильных ферментов, способных работать с повышенной активностью в жестких условиях современных промышленных реакторов, а также проверка эффективности работы этих методов на примере коротких пептидов и глобулярных белков.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие задачи:

1) Исследование молекулярных механизмов гидратации пептидов и белков и создание на этой основе новой вычислительно эффективной модели гидратации, включающей в себя все основные физические факторы, играющие значительную роль в этом процессе.

2) Исследование причин термостабильности белков из термофильных бактерий с помощью методов молекулярного моделирования, молекулярной динамики и сравнительного

анализа термофильных и мезофильных белков из нескольких различных суперсемейств белков.

3) Создание статистико-механической модели, описывающей термодинамику сворачивания белковых α -спиралей при различных условиях окружающей среды (температура, рН и ионная сила раствора и т.д.) и позволяющей с большой точностью предсказывать конформационную стабильность α -спиралей в мономерных пептидах.

4) Создание на основе этой теоретической модели нового, практически важного метода конструирования белков и соответствующих компьютерных программ для глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей α -спиралей белков, позволяющих стабилизировать их структуру при высоких температурах.

5) Конструирование с помощью этого метода термостабильных мутантов глюкоамилазы из гриба *Asp. awamori*, а также исследование их активности при высоких температурах.

Научная новизна

1) Предложен новый вычислительно эффективный способ расчета свободной энергии образования водородных связей белка с окружающим его растворителем (водой), включая и расчет всех возможных водных мостиков в данной конформации белка.

2) Показано, что часто используемое предположение о постоянстве атомарных параметров гидратации (АПГ) полярных и заряженных групп не применимо для расчета гидратации глобулярных белков. Получены аналитические выражения для зависимостей АПГ полярных и заряженных групп белков от их ПДР.

3) Предложена новая модель гидратации белков, включающая водородные связи между белком и водой, электростатическую поляризацию воды, ван-дер-ваальсовы взаимодействия и энтропийные потери. Расчеты гидратации белков в свернутой и развернутой конформации показали, что гидратация в значительной мере компенсирует внутрибелковые взаимодействия при сворачивании глобулярных белков в нативную конформацию.

4) Предложен новый вычислительно эффективный непараметрический метод приближенного расчета ПДР биомакромолекул.

5) Проведен сравнительный анализ термофильных белков из нескольких независимых суперсемейств и их мезофильных аналогов, который показал, что повышенная стабильность

их α -спиралей является необходимым, но недостаточным фактором общей термостабильности этих белков.

6) Впервые было показано, что основными физическими факторами, определяющими стабильность α -спиралей этих термостабильных белков, являются так называемые структурные тенденции (СТ) аминокислот к образованию α -спиральной конформации и взаимодействия боковых групп аминокислот.

7) Впервые показано, что белки суперсемейства RecA имеют примерно одинаковую стабильность при нормальных температурах обитания их организмов-хозяев.

8) На основе модифицированной модели AGADIR (V. Munoz, L. Serrano (1994). Nat. Struct. Biol. 1(6): 399-409) впервые создан метод глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей белковых α -спиралей. Создана оригинальная компьютерная программа для глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей α -спиралей коротких пептидов и белков. Программа способна искать уникальные аминокислотные последовательности, имеющие максимально возможное количество стабилизирующих взаимодействий в α -спиральных конформациях. При этом предусмотрена возможность произвольно фиксировать любые фрагменты первичной структуры (например, аминокислоты, участвующие во взаимодействиях, стабилизирующих третичную структуру белка) в их нативных последовательностях. В отличие от имеющихся в настоящее время способов частичной термостабилизации белков с помощью точечных аминокислотных замен, разработанный метод основан на осуществлении множественных аминокислотных замен, позволяющих оптимизировать те физические взаимодействия в α -спиралях белков, которые не влияют на активность, но увеличивают стабильность белков в экстремальных температурных условиях.

9) Определены аминокислотные последовательности с близким к максимальному количеством внутриспиральных стабилизирующих взаимодействий для пептидов длиной 13, 14, 15 и 16 остатков. По данным КД спектроскопии, содержание α -спиральной конформации в нескольких коротких синтетических пептидах с оптимизированными последовательностями оказалось в хорошем согласии с теоретическими предсказаниями модели.

10) На основе известной пространственной структуры глюкоамилазы из мицелиального гриба *Asp. awamori*, фермента, используемого при производстве биоэтанола, с помощью разработанных нами методов сконструировано и биохимически исследовано несколько аминокислотных замен (G127A, P128A, I136L, G137A и G139A), оптимизирующих внутренние взаимодействия в α -спирали "D" этого фермента. Полученные

экспериментальные данные показали, что один из созданных нами мутантов глюкоамилазы показал рекордную на сегодняшний день термостабильность.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Новый непараметрический метод приближённого расчёта площади ПДР, и аналитические выражения для расчета её первых производных по координатам атомов молекулы.
2. Аналитические выражения, позволяющие на основе площади ПДР полярных и заряженных атомов белка эффективно вычислять свободные энергии образования ими водородных связей (включая водные мостики) с окружающим белок растворителем.
3. Некорректность широко используемых предположений о постоянстве атомарных параметров гидратации для описания взаимодействий полярных и заряженных атомов глобулярных белков с водой. Аналитические выражения для расчета зависимости атомарных параметров гидратации (АПГ) от площади поверхности, доступной растворителю (ПДР).
4. Зависимость альфа-спиральных структурных тенденций аминокислот (СТ) от их положения в альфа-спиралях.
5. Повышенная стабильность α -спиралей является необходимым, но недостаточным условием термостабильности суперсемейства белков RecA. Кроме того, проведенный анализ показал, что исследованные белки при нормальных условиях функционирования их организмов-хозяев имеют примерно одинаковый уровень конформационной стабильности их α -спиралей.
6. Новый практически важный метод глобальной оптимизации первичной структуры α -спиралей белков, имеющих максимально высокую конформационную стабильность.
7. Аминокислотные последовательности длиной 10, 11, 12, 13 аминокислотных остатков, имеющие близкую к максимально возможной конформационную стабильность в α -спиральной конформации.
8. Новые аминокислотные замены в α -спирали D глюкоамилазы из мицелиального гриба *Aspergillus awamori* (ГА), повышающие ее конформационную стабильность при высоких температурах. Было показано, что в отличие от аминокислотной замены R128A, замены G137A, I136L и G139A имеют сильный термостабилизирующий эффект.

Теоретическая и практическая значимость

В настоящее время моделирование взаимодействий белков и других биомакромолекул с окружающим растворителем является основным источником ошибок в расчетах свободной

энергии при молекулярном моделировании и молекулярной динамики этих молекул. Полученные в работе аналитические выражения для зависимостей свободной энергии образования водородных связей полярных и заряженных групп белка с молекулами воды от площади их ПДР могут быть использованы для уточнения непрерывных моделей гидратации белков, основанных на вычислении площади ПДР (А.Н. Juffer et al. (1995) *Protein Sci* **4**(12): 2499-509). Кроме того, разработанный нами новый метод приближённого вычисления площади ПДР биомакромолекул может значительно повысить вычислительную эффективность этих методов при расчетах энергии гидратации белков в произвольной конформации.

Кристаллические структуры многих известных белков имеют большое количество α -спиралей, образующих каркас их пространственной структуры. В предлагаемой работе было впервые показано, что стабильность α -спиралей во многом определяет и общую термостабильность белков. Это обстоятельство может быть использовано для конструирования термостабильных белков, работающих в жестких условиях современных промышленных реакторов. Это имело бы огромное практическое значение для биотехнологической промышленности. В предлагаемой работе впервые был разработан и испытан новый метод создания термостабильных ферментов, который основан на глобальной оптимизации их аминокислотных последовательностей, позволяющей стабилизировать структуру ферментов при высоких температурах. Метод использует модифицированную теоретическую модель AGADIR, описывающую термодинамику сворачивания α -спиралей при различных условиях окружающей среды (температура, pH и ионная сила раствора). Модификации модели были разработаны в нашей совместной работе с европейскими (лаб. проф. Serrano, EMBL, Германия) и японскими (лаб. проф. Yumoto, ONRI, Осака) коллегами. Было показано, что эта модель хорошо воспроизводит экспериментальные данные по термостабильности как мономерных α -спиральных пептидов, так и глобулярных белков.

Использование биоэтанола в качестве топлива в виде 10-20% добавок в бензин получило широкое распространение во многих развитых странах. Одним из наиболее широко используемых ферментов при производстве биоэтанола является нетермостабильная глюкоамилаза, выделяемая из мицелиального гриба *Asp. awamori* (Б. Глик, и Д. Пастернак (2002). "Молекулярная биотехнология." Москва, Мир). Были определены несколько вариантов аминокислотных замен, необходимых для увеличения термостабильности глюкоамилазы из гриба *Asp. awamori*. Соответствующие мутантные гены были сконструированы генно-инженерными методами и клонированы в *Saccharomyces cerevisiae*. Соответствующие мутантные белки были экспрессированы, выделены и очищены. Была

исследована их активность при различных температурах. Один из полученных термостабильных мутантов показал рекордную термостабильность и оказался способным работать вплоть до температуры 80°C.

В отличие от α -амилаз, глюкоамилазы очень редко встречаются в гипертермофильных бактериях и археобактериях. Несмотря на их высокую термостабильность, в промышленном производстве они не применяются из-за сравнительно низкой активности (Ford, C. (1999). *Curr Opin Biotechnol* 10(4): 353-357). Вместо этого используется глюкоамилаза из *Asp. awamori*, имеющая высокую активность при умеренных температурах и нейтральных значениях pH, что вынуждает производителей этанола вводить специальную стадию в технологическом процессе, терять энергию, время и эффективность производства этанола на охлаждение промежуточного оживленного продукта до требуемых более низких температур. Получение термостабильного мутанта глюкоамилазы с повышенной активностью, способного стабильно работать при 95°C и выше, позволило бы сократить целую стадию в этом биотехнологическом процессе и, таким образом, оптимизировать затраты и эффективность этого широкомасштабного производства.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на 18 международных и отечественных научных конференциях.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 29 статей, из них 17 в международных, 12 в российских журналах и сборниках научных работ (см. список на стр. 27).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 241 страницах и содержит введение и следующие 7 глав: «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Молекулярные механизмы гидратации белков», «Факторы, влияющие на конформационную стабильность α -спиралей белков», «Влияние стабильности α -спиралей на термостабильность белков», «Конструирование стабильных α -спиралей белков с помощью глобальной оптимизации их аминокислотных последовательностей», «Рациональное конструирование термостабильных мутантов глюкоамилазы из гриба *Asp. awamori*», «Общие выводы». Материалы диссертации иллюстрированы 41 рисунком и 16 таблицами. Список цитируемой литературы включает 243 публикации.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснованы актуальность темы, практическая значимость и новизна диссертационной работы, сформулированы цели и задачи исследования, приведены основные научные положения, выносимые на защиту.

Глава 1. Обзор литературы

Подробно рассмотрены опубликованные к настоящему времени модели гидратации белков, известные молекулярные механизмы термостабилизации белков, а также использование термостабильных ферментов в биотехнологии.

Глава 2. Материалы и методы

В этой главе описаны экспериментальные и теоретические методы исследования, использованные в работе. Синтез пептидов проводился с помощью автоматического синтезатора пептидов. Гомогенность пептидов проверялась с помощью аналитических методов HPLC. Корректность их аминокислотных последовательностей проверялась с помощью методов времяпролетной масс-спектропии с лазерной ионизацией.

Спектры кругового дихроизма (КД) пептидов регистрировались на инструменте JASCO-710 в диапазоне 190 - 250 нм, при стандартных условиях. Для того, чтобы проверить отсутствие возможной зависимости спектров КД от концентрации пептидов использовались различные уровни разбавления пептидов в диапазоне их концентраций от 10 μM до 500 μM . Спиральное содержание пептидов оценивалось с помощью средней на остаток эллиптичности при 222 нм (Y.H.Chen, et al. (1974). *Biochemistry* 13(16): 3350-3359).

Карты заселенности различных конформаций аминокислот в α -спиралях белков получены с помощью статистического анализа 315 белковых кристаллических структур, полученных с высоким разрешением и с менее чем 25%-ой гомологией с помощью программы WHATIF (G.Vriend (1990) *J. Mol. Graph.* 8(1): 52-56). Кристаллические структуры белков были взяты из белкового банка данных PDB. Для молекулярного моделирования коротких пептидов и белков (построение энергетических профилей, молекулярной динамики, Монте-Карло-минимизации и электростатических полей белков в водном окружении) использовались следующие широко используемые пакеты программ: ICM-Pro, AMBER, GROMACS, DELPHI и APBS. Расчеты проводились также с помощью статистико-механической модели AGADIR, описывающей переходы случайный клубок – α -спираль в мономерных пептидах. Следующие

энергетические вклады в свободную энергию были включены в вычисления статистических сумм всех возможных спиральных сегментов рассматриваемых пептидов в модели AGADIR: образование водородной связи в основной цепи; потери энтропии при принятии аминокислотами спиральных двугранных углов их основной цепи; кэппинг взаимодействия на N- и C-концах пептидов; и взаимодействия боковых групп между собой и макродиполем α -спирали.

Конструирование термостабильных форм глюкоамилазы проводили с помощью оптимизации внутриспиральных взаимодействий α -спирали “D”. Энергетические расчеты проводили на основе модифицированной статистико-механической модели AGADIR, описывающей переходы α -спирали, – случайный клубок в белках. Моделирование молекулярной динамики (МД) глюкоамилазы в периодическом водном боксе длиной 10 нс при температуре 70°C с шагом 2 фс производили с помощью программного комплекса GROMACS и стандартных протоколов МД (D. Van der Spoel, (2005). J Comput Chem **26**(16): 1701-1718). Полученную траекторию МД использовали для анализа подвижности вторичной структуры исследуемого белка.

Для генетических манипуляций в работе использовали штаммы *E.coli* DH5 α и *S. cerevisiae* C468 генотипа *MAT α leu2-3,112 his3-11,15*. Ген *GAI* гриба *Asp. awamori*, кодирующий глюкоамилазу был включен в плазмиду эписомного типа YерPM18 (предоставлена проф. Reilly университет штата Айова, США). Для введения нуклеотидных замен в кодирующую последовательность гена ГА использовали стандартный набор “QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit” (Stratagene, США). Наличие введенных мутаций в конечных конструкциях проверяли секвенированием. Для экспрессии мутантных форм гена глюкоамилазы, соответствующие варианты плазмиды YерPM18 выделяли из клеток *E. coli* DH5 α методом щелочного лизиса и трансформировали в дрожжевой штамм *S. cerevisiae* C468 по признаку лейциннезависимости на селективной среде, содержащей добавку гистидина. Выделение и очистка мутантных форм глюкоамилазы проводились стандартными методами. В качестве основного критерия термостабильности фермента с помощью стандартных методов исследовали температурные зависимости констант его термоинактивации.

Глава 3. Молекулярные механизмы гидратации белков

Моделирование молекулярной динамики (МД) крамбина из *Crambe abyssinica* в периодическом водном боксе показало, что водородные связи различных участков его поверхности с окружающими молекулами воды имеют весьма различную стабильность в зависимости от их химической природы, пространственной структуры и величины ПДР. Из

траекторий МД были получены зависимости вероятностей образования водородных связей белок-вода (P_{hb}) от ПДР для всех основных полярных и заряженных групп белка, имеющие вид простых гиперболических функций вида (Рис.1):

$$P_{hb} = \frac{ПДР_i}{A + B \times ПДР_i}, \quad (1)$$

где A и B являются константами, зависящими от типа химической группы белка, участвующей в образовании водородной связи с молекулами воды. Форма аналитических выражений для зависимостей P_{hb} от ПДР была получена на основе теоретического анализа кинетики реакции многоцентрового связывания лиганда (т.е. молекулы воды) с рецептором (т.е. донорной или акцепторной группой белка).

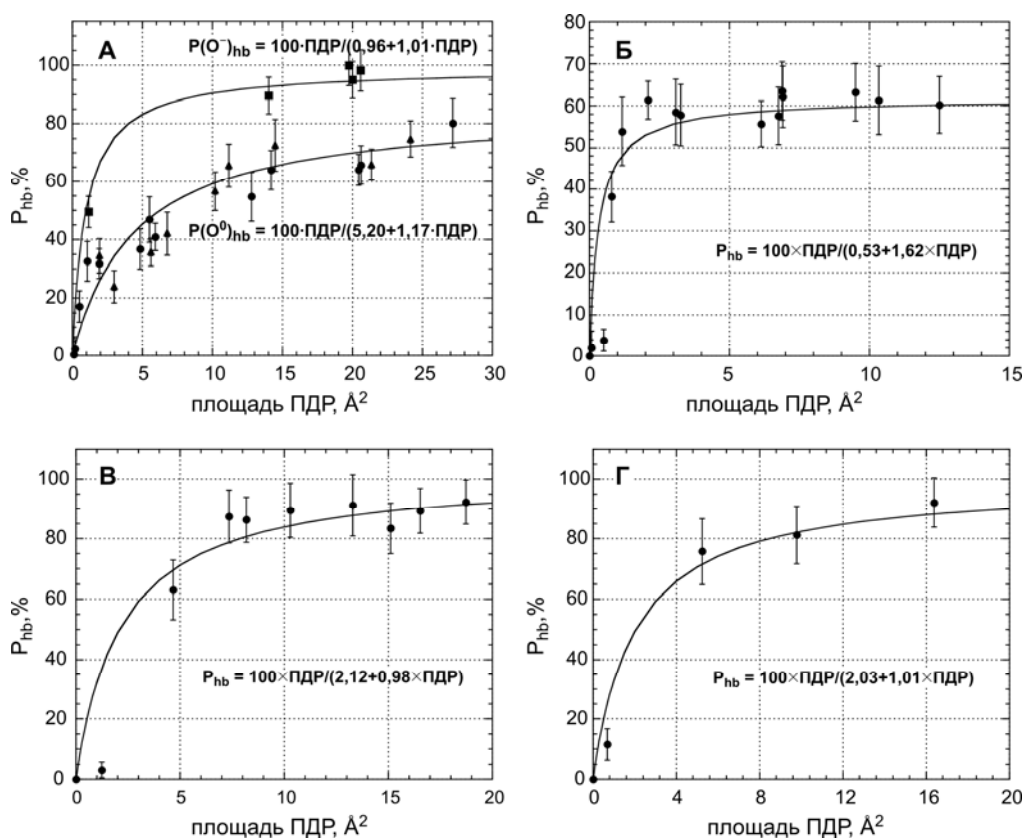


Рис. 1. Корреляционные графики площади ПДР акцепторных (А) и донорных (Б, В, Г) групп белка и вероятности образования водородных связей этими химическими группами. В секции (А) ● и ▲ относятся к незаряженным карбонильным группам основной цепи белка и гидроксильным группам боковых цепей аминокислот, соответственно; ■ относится к заряженным атомам кислорода карбоксильных групп боковых цепей Asp и Glu. (Б) Незаряженные группы NH и NH₂ в основной цепи белка и боковых ветвей аминокислот; (В) незаряженные группы OH в боковых цепях Ser и Thr; (Г) заряженные группы NH₂⁺ и NH₃⁺. Для групп-доноров водородной связи площадь ПДР относится к атомам водорода этих групп. На рисунке приводятся параметры аппроксимации кривой по формуле 1.

На этой основе предложен новый способ вычислительно-эффективного расчета свободной энергии образования водородных связей белка с водой. В случае образования одной водородной связи между белком и молекулой воды свободная энергия образования этой связи, ΔG_{hb} , может быть вычислена с помощью классического соотношения между изменением свободной энергии реакции связывания лиганда с рецептором и константой равновесия:

$$\Delta G_{hb} = -RT \ln \left(\frac{P_{hb}}{1 - P_{hb}} \right), \quad (2)$$

где R – универсальная газовая постоянная, T – температура, и P_{hb} – вероятность образования водородной связи между белком и молекулой воды. При этом полагалось, что в роли рецептора выступает полярная или заряженная группа белка, а в роли лиганда – молекула воды.

Как можно видеть из графиков, изображённых на рис. 2., производная от функции, отвечающей за вклад водородных связей в общую энергию гидратации белка, не является константой, а существенным образом зависит от площади ПДР рассматриваемого атома белка.

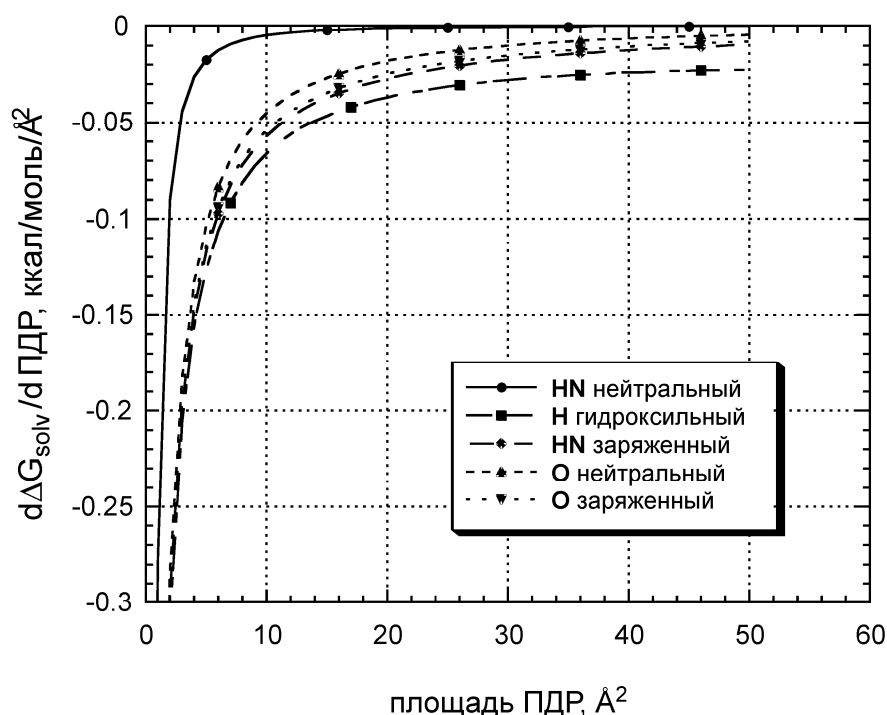


Рис. 2. Зависимости АПГ для пяти основных полярных и заряженных групп белков от площади их ПДР с использованием параметров функций, указанных на рис 1.

Тем не менее, во многих моделях гидратации белков, основанных на расчётах площади ПДР, вводятся постоянные величины АПГ для базисных типов атомов, и, следовательно, предполагается линейная зависимость энергии гидратации от площади ПДР атомов, экспонированных на поверхность белка (А.Н. Juffer et al. (1995) Protein Sci 4(12): 2499-509).

Можно получить аналитическое выражение для АПГ как производной энергии образования водородных связей белка с водой по площади ПДР отдельных атомов молекулы:

$$\frac{d\Delta G_{hb}}{dПДР_i} = -RT \frac{1}{ПДР_i \times \left(1 + \frac{B-1}{A} ПДР_i\right)} \quad (3)$$

где А и В соответствующие константы из формулы 1.

Видно, что кривые зависимости АПГ от ПДР имеют участки быстрого возрастания ($<10 \text{ \AA}^2$) и участки насыщения ($>10 \text{ \AA}^2$). Многие модели непрерывного растворителя были параметризованы на основе экспериментальных данных по переносу небольших органических молекул, сходных по химической структуре с основной и боковыми цепями аминокислот, из неполярного окружения в водное. В таких молекулах атомы имеют максимально большие значения площади ПДР, которые соответствуют району насыщения на наших графиках. Отсюда становится понятным, почему авторы таких непрерывных моделей смогли успешно их параметризовать в предположении о постоянных значениях атомарных параметров гидратации (С. Chothia, (1974). Nature 248(446): 338-339, D. Eisenberg et al. (1986) Nature 319(6050): 199-203, Т. Ooi et al. (1987) PNAS USA 84(10): 3086-3090, L. Wesson et. al. (1992) Protein Sci. 1(2): 227-235 и др.). Однако в белках, по сравнению с небольшими органическими молекулами, экспонированные на поверхность атомы в значительной мере подвержены влиянию более плотного окружения соседних атомов, а, следовательно, имеют меньшую площадь ПДР. Наши расчёты показывают, что средние значения площади ПДР рассматриваемых типов атомов в белках распределены в большей степени в области от 0 \AA^2 до 10 \AA^2 , и таким образом попадают в участок быстрого возрастания на графике, где АПГ нельзя считать постоянными.

Влияние водных мостиков на конформационную стабильность белка

В этой главе диссертации представлен новый вычислительно эффективный способ расчета свободной энергии одного из наиболее простых структурных мотивов воды на поверхности белка - водных мостиков. Рис. 3 показывает, что вероятности образования водных мостиков на поверхности белка могут быть получены с помощью выражения:

$$P_{wb} = 1 / (1 + e^{(E_{wb} + C) / RT}) \quad (4)$$

где E_{wb} – энергия всех взаимодействий между данной молекулой воды и белком, а С – константа. Величина E_{wb} может быть эффективно вычислена с помощью одного из стандартных силовых полей для данного водного мостика в конкретной конформации белка. Используя стандартные геометрические критерии для формирования водородной связи

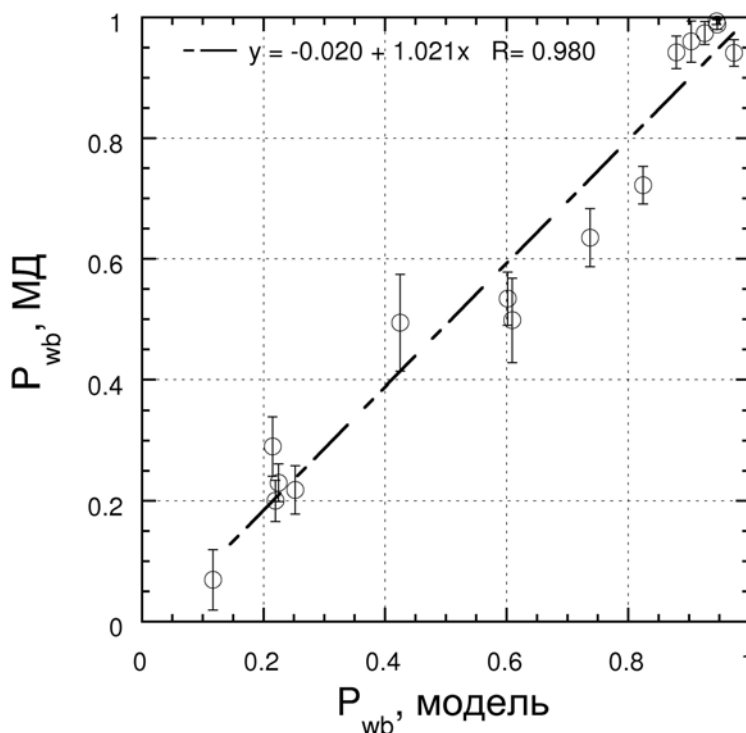
между молекулами воды и белковыми группами, мы можем идентифицировать все возможные водные мостики для любой конформации белка. Зная C , мы можем вычислительно эффективно вычислить P_{wb} и ΔG_{wb} , используя формулу, аналогичную формуле 2.

При моделировании МД мы наблюдали несколько случаев, где молекула воды находилась в сайте связывания около 150 пс. Однако, в большей части случаев, среднее время существования водного моста было в диапазоне 10-20 пс. Эти данные находятся в согласии с имеющимися данными ЯМР, где время пребывания молекул воды на белковой поверхности находится в субнаносекундном диапазоне. Таким образом, динамические свойства воды в водных мостиках белков могут меняться в широком диапазоне от 10 до 150 пс, что связано со значительными изменениями их свободной энергии образования.

Необходимо отметить хорошую корреляцию (см. рис. 3) между величинами P_{wb} , полученными при моделировании МД и вычисленными с помощью уравнения 4 с константой $C=7.7$ ккал/моль. Таким образом, результаты моделирования МД белка в периодическом водном боксе подтверждают гипотезу о том, что величина C не зависит от конформации белка, контекста его аминокислотной последовательности или типа водного мостика.

Расчеты, проведенные с помощью модели, описывающей водные мостики, показали, что на поверхности глобулярных белков также имеется большое количество сайтов связывания воды с возможностью образования стабильных водных мостиков.

Рис. 3. Корреляция между вероятностями образования водных мостиков P_{wb} , рассчитанными с помощью предлагаемой нами модели и полученными с помощью моделирования МД в периодическом водном боксе для пентапептидов Gly-Gly-X-Gly-Gly, замещенных остатками Gly, Ser, Thr, Asn и Gln.



Расчеты показали, что на поверхности глобулярных белков доминируют водные мостики типа АА (более 90% всех случаев), где пары доступных растворителю карбонильных кислородов основной цепи белка часто представляют хорошие возможности для образования стабильных водных мостиков. Иногда могут встречаться водные мостики других типов (ДА и ДД), однако их содержание составляет не более нескольких процентов и, соответственно, их вклад в стабильность белка не превышает нескольких ккал/моль.

JNA - новый метод расчета доступной растворителю поверхности макромолекул

В этой главе описывается новый метод приближённого вычисления площади ПДР. В отличие от известных методов этого класса в разработанном методе отсутствуют эмпирические параметры. Метод обладает повышенной точностью, которая не зависит от химической природы и конформации исследуемой молекулы. В работе получены аналитические выражения и разработан алгоритм вычисления первых производных ПДР от координат атомов белка.

Основными проблемами опубликованных на данный момент методов этого класса являются недостаточная точность вычислений и наличие большого количества эмпирических параметров, зависящих от химической природы и конформации исследуемой макромолекулы, что ограничивает применимость приближённых методов расчёта тем классом молекул, на котором они были параметризованы (S. Wodak et.al. (1980). PNAS USA 77(4): 1736-1740, J. Weiser et al. (1999) Biopolymers 50(4): 373-80. J. Comp. Chem. 20(2): 217-230, J. Comp. Chem. 20: 688-703, O. Guvench et al. (2004) J Comput Chem 25(8): 1005-1014 и др.). В предложенном методе площадь ПДР отдельного атома рассматриваемой молекулы вычисляется с помощью рекурсивной процедуры попарного объединения сфер соседних атомов. При объединении пары сфер вычисляются площади, вырезаемые из поверхности рассматриваемой сферы каждой из сфер по отдельности, и площадь, вырезаемая пересечением этих двух сфер. В работе анализируются все возможные варианты “истинных” и “ложных” пересечений трёх сфер и приводятся аналитические выражения для вычисления площади, вырезаемой из поверхности рассматриваемой сферы S_i парой соседних сфер во всех возможных случаях пересечений.

Для проверки точности метода JNA (Joint Neighbors Approximation) результаты вычисления приближённой площади ПДР сравнивали с результатами вычислений, выполненных точным аналитическим методом (табл. 1). В качестве тестового набора был выбран широкий спектр молекул разной химической природы, куда вошли небольшие органические молекулы, РНК, ДНК и белки в свёрнутой и в развёрнутой конформациях.

Можно заметить, что метод JNA демонстрирует более высокую точность расчёта ПДР для многоатомных макромолекул по сравнению с небольшими органическими молекулами. Применение метода JNA к белкам в развёрнутой конформации показывает несколько меньшую точность по сравнению с их свёрнутыми формами. Присутствие атомов водорода в рассматриваемых молекулах существенно повышает точность вычислений метода. Во всех случаях коэффициенты корреляции между точными и рассчитанными нами, приближенными значениями ПДР составлял >0,99.

Табл. 1. Результаты тестирования точности расчётов метода JNA, проведённого на трёх стандартных наборах молекул.

Репрезентативный набор молекул	Средние атомарные отклонения, Å ²		Максимальн. атомарные отклонения, Å ²		Ошибки вычисления ПДР, %	
	Мин. знач.	Макс. знач.	Мин. знач.	Макс. знач.	Мин. знач.	Макс. знач.
Небольшие органические молекулы, РНК, ДНК, белки и их комплексы*	1,20	3,47	5,09	18,91	0,05	7,30
Свёрнутые белки**	0,78	0,97	10,61	14,86	3,0	8,5
Развёрнутые белки**	1,65	1,87	9,47	16,78	2,37	8,63

* Набор молекул взят из работы Weiser et al. (J.Comp.Chem.-1999.Vol.20.-P.217-230).

** Набор белков взят из работы Guvench и Brook (J.Comp.Chem.-2004.Vol.25.-P.1005-1014)

В работе проводилось сравнение точности результатов вычислений методом JNA с точностью двух альтернативных приближённых методов расчета ПДР. Оказалось, что метод JNA рассчитывает средние атомарные величины ПДР с существенно меньшей ошибкой и производит меньшие максимальные атомарные отклонения ПДР.

Глава 4. Факторы, влияющие на конформационную стабильность α -спиралей белков

У каждой из 20 природных аминокислот имеется характерная внутренняя, связанная с ковалентной структурой, тенденция (СТ) участвовать в образовании α -спиральных

конформаций в пептидах и белках. Например, энтропийные потери, связанные с изменением набора разрешенных конформационных состояний боковых цепей аминокислот. Кроме этого, на стабильность α -спиральных конформаций белков влияют и другие возможные взаимодействия (гидрофобные, электростатические, водородные связи и т.д.). Обычно предполагается, что СТ не зависит от их положения в α -спирали. Однако, первый и последний виток α -спирали не эквивалентны остальной части спирали. В частности, из распределения ротамеров в базе данных структур белков PDB известно, что подвижность боковой цепи Val в центральных позициях спирали сильно ограничена по сравнению с несколькими N-концевыми положениями.

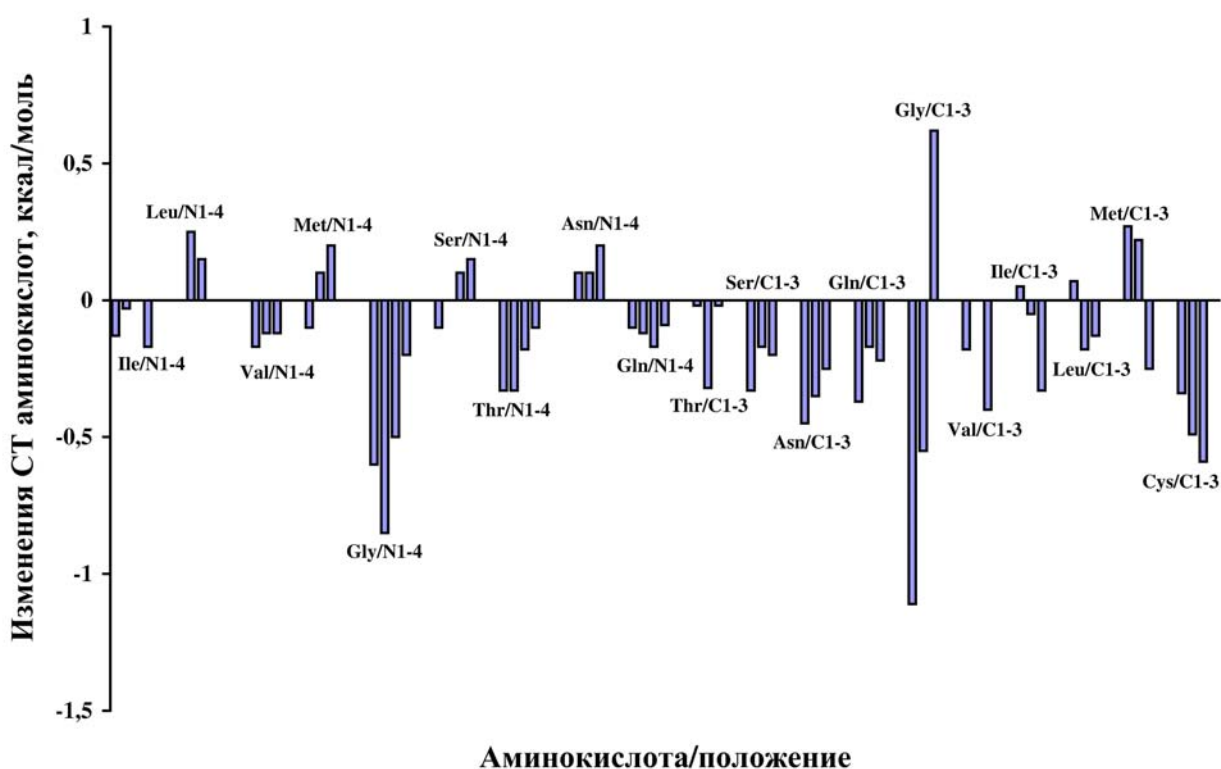


Рис. 4. Зависимость СТ аминокислот от положения в α -спиралях модельных пептидов. Данные СТ для каждой аминокислоты приведены относительно их СТ в центральном положении α -спирали, которые приняты за ноль.

Чтобы изучить влияние позиционного эффекта СТ на стабильность α -спиралей, мы синтезировали две серии коротких пептидов на основе Ala (NPEP: Fr/Ac-AAAAAAAAARAAARGGY-NH₂ и CPEP: Fr/Ac-YGGSAKDAAARAAAAAAAAA-NH₂), имеющих замещения различными гидрофобными и гидрофильными остатками в положениях N1, N2, N3 и N4 N-концевого витка, в положениях C1, C2 и C3 C-концевого витка и в центральном положении N_c α -спиралей. Аминокислотные последовательности этих пептидов были сконструированы таким образом, чтобы при введении в их структуру исследуемых остатков

затрагивать только изменения СТ и исключить изменения взаимодействий боковых групп, влияющих на конформационную стабильность пептидов. Конформационная стабильность пептидов была исследована с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД) в области дальнего ультрафиолета (УФ). Результаты КД-спектроскопии интерпретировались в терминах изменения свободной энергии исследуемых пептидов с помощью AGADIR - статистико-механической модели, описывающей переходы спираль/клубок в мономерных пептидах. Всего было экспериментально исследовано 102 пептида.

Спектры КД модельных пептидов имеют типичные характеристики, соответствующие α -спиральным пептидам различной конформационной стабильности. Полученные результаты показывают, что вклад СТ аминокислот в общую свободную энергию белка различен в положениях первого и последнего витка α – спирали (см. Рис. 4). Эффект имеет комплексную природу и изменяется по величине для различных аминокислот от 0 до 1.1 ккал/моль.

Чтобы интерпретировать наши результаты в терминах индивидуальных вкладов свободной энергии, были выполнены энергетические расчеты в потенциале ECEPP (пакет программ ICM-Pro). Результаты этих расчетов показывают, что зависимость СТ аминокислот от положения внутри α -спирали является суммой трех физических факторов: (а) больший доступ растворителя к боковой цепи в первом витке по сравнению с центральным положением спирали; (б) меньше внутримолекулярных ван-дер-ваальсовых контактов между атомами боковых цепей белка; (в) более высокая конфигурационная энтропия белка.

Глава 5. Влияние стабильности α -спиралей на термостабильность белков

Особенности структурной организации белков и ферментов, оптимум функциональной активности которых приходится на область высоких температур (65-100°C), активно обсуждаются в литературе на основе сравнительного анализа пространственных структур белков из мезофильных и термофильных микроорганизмов. В работе мы использовали теоретическую модель AGADIR (V.Munoz, L. Serrano (1995) J. Mol. Biol. 245(3): 275-296, 297-308) для расчета изменения свободной энергии образования α -спиральных сегментов высокомолекулярных бактериальных белков RecA, представленных 31 членом этого суперсемейства, четыре из которых являются терморезистентными. Оценка внутренней стабильности α -спиралей прямо связана с изменениями свободной энергии их образования ΔG : чем ниже последняя, тем выше первая. Используемый нами модифицированный алгоритм AGADIR вовлекал в анализ не только аминокислоты, входящие в состав α -спирали, но и по одной аминокислоте с N- и C-конца спирали, которые могут принимать участие в так

называемых capping-взаимодействиях. Кроме того расчеты ΔG включали все известные физические взаимодействия, которые влияют на стабильность α -спиралей.

Показано, что белки RecA из группы термофилов обладают наибольшей суммарной стабильностью α -спиралей. Суммарная свободная энергия их α -спиралей на 5-9 ккал/моль ниже, чем у мезофильных аналогов. Такое снижение ΔG приблизительно соответствует росту термостабильности белков при повышении температуры на 10-30°C. В целом, представленные данные показывают, что "сильные" α -спирали, по-видимому, являются необходимым условием термостабильности белков RecA. Наличие высоких показателей α -спиральной стабильности у некоторых белков из мезофильных организмов, в том числе и *E.coli*, ясно показывает, что это условие не является достаточным. Наряду с α -спиралями другие элементы вторичной структуры (β -структуры и повороты), а также, третичные взаимодействия между ними влияют на стабильность белка RecA при повышенных температурах.

Мы выбрали по одному характерному представителю эубактерий из каждого природного депо, т.е. психротроф *P. aeruginosa*, мезофил *E. coli* и термофил *T. thermophilus*, белки RecA которых были исследованы биохимически, и проанализировали изменение величины $\Sigma\Delta G$ для α -спиралей этих белков при трех указанных температурах. Как видно из рис. 5, каждый из этих белков характеризуется близкой величиной $\Sigma\Delta G$, рассчитанной при нормальных температурах обитания соответствующего микроорганизма.

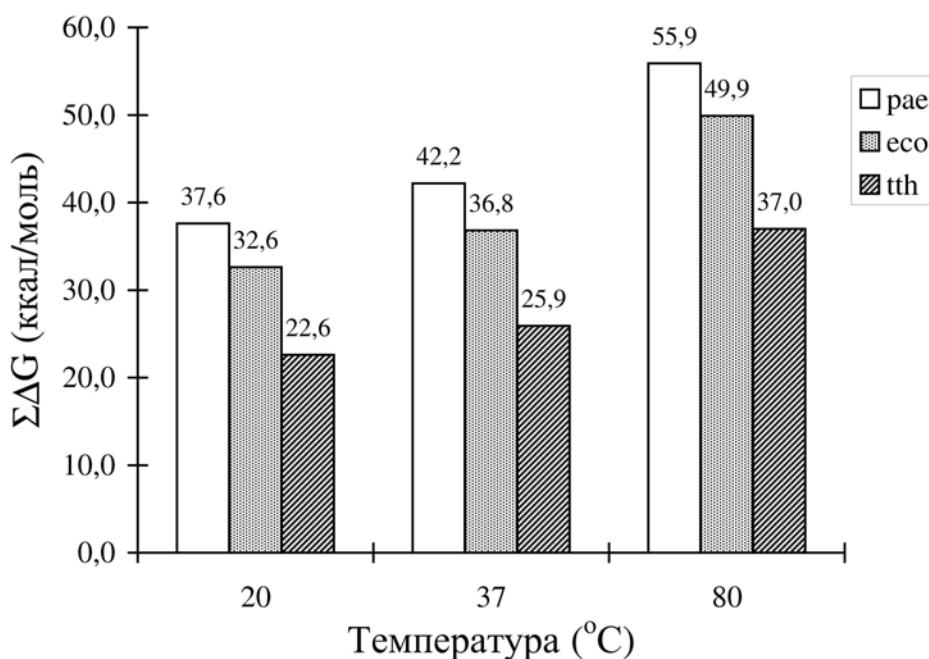


Рис. 5. Температурная зависимость величины свободной энергии образования α -спиралей у белков RecA из психротрофа *P. aeruginosa* (*pae*), мезофила *E. coli* (*eco*) и термофила *T. thermophilus* (*tth*), рассчитанная с помощью модифицированной модели AGADIR.

Таким образом, проведенный анализ показал, что оптимальная жесткость α -спиралей белка RecA, охарактеризованная количественно величиной свободной энергии их

образования (~37 ккал/моль), является постоянной для всех изученных белков семейства RecA. Выделено три класса белков RecA эубактерий, реализующих оптимальную жесткость своей структуры при трех разных температурах (20, 37 и 80°C), приблизительно соответствующих нормальной температуре обитания их организмов-хозяев. Как известно конформационная подвижность влияет на активность ферментов (температурные зависимости). Очевидно, для нормального функционирования живой клетки необходимо поддерживать определенный уровень активности ее белков.

Глава 6. Конструирование стабильных α -спиралей белков с помощью глобальной оптимизации их аминокислотных последовательностей

В работе был впервые разработан и экспериментально испытан новый метод для конструирования пептидов и белков с повышенной конформационной стабильностью с помощью глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей их α -спиралей. Метод использует Туннельный алгоритм (A.V. Levy, A. Montalvo (1985) SIAM J. Sci. Stat. Comput. 6: 15-29) для глобальной оптимизации целевой функции, построенной на основе модифицированной теоретической модели AGADIR, описывающей термодинамику сворачивания α -спиралей белков при различных условиях окружающей среды. Туннельный алгоритм глобальной оптимизации, используемый в наших вычислениях, включает две фазы: фазу локальной минимизации и фазу туннелирования. Эти фазы алгоритма работают поочередно, сменяя друг друга. Во время фазы минимизации целевая функция $f(x)$ минимизируется локальным методом оптимизации – методом сопряженных градиентов. Во время туннельной фазы алгоритм стартует из окрестности точки x^* , достигнутой во время предыдущей фазы, и ищет любое нулевое значение вспомогательной функции:

$$T(x, x^*, f^*) = \frac{f(x) - f^*}{(x - x^*)^{2a} (x - x^m)^{2b}} \quad (5)$$

методом Ньютона, где x^* и a - это положение и сила неподвижного полюса, соответственно; x^m и b - положение и сила подвижного полюса; и $f^* = f(x^*)$. Функция $T(x, x^*, f^*)$ имеет непрерывные производные и то же самое множество нулевых значений, что и функция $f(x) - f^*$. Цель туннельной фазы - поиск точки $x \neq x^*$ для которой $f(x) \leq f(x^*)$. Очевидно, что такая точка в пространстве переменных целевой функции была бы очень привлекательна как исходная точка для последовательной фазы локальной минимизации. Несходимость туннельной фазы во время выполнения 1000 итераций алгоритма является условием завершения процесса оптимизации.

При использовании Туннельного алгоритма для оптимизации аминокислотных последовательностей необходимо рассматривать аминокислоты первичной структуры пептида как действительные переменные. Поэтому, мы интерполировали все дискретные энергетические параметры модели AGADIR в статистико-механических вычислениях целевой функции следующим образом: а) целые числа от 1 до 20 были назначены для каждого типа природных аминокислот; б) энергетические параметры системы модели AGADIR были приняты для этих целых чисел на отрезке действительной оси от 1 до 20; в) искусственные энергетические барьеры величиной 2.5 ккал/моль были установлены для средних точек между целыми числами, назначенными для каждой аминокислоты; и г) полученные с помощью кубических сплайнов, регулярные сети энергетических параметров модели AGADIR и барьеров использовались для одномерной и двумерной интерполяции всех дискретных энергетических параметров на действительной оси переменных аминокислот.

Табл. 2. Последовательности и результаты КД измерений и теоретических расчетов для пептидов с оптимизированными последовательностями^а.

Пептид (последовательность)	$-\theta_{222}$ (град·см ² /дмол)	Содержание α -спиральной конформации (эксп.) %
A (TEAEERAKAAGGY-amide)	8974	28.9
B (TEAEERAKASGGY-amide)	7773	25.0
C (TEQEERERLRKGGY-amide)	15095	47.6
D (TEQEERERARKGGY-amide)	14466	45.6
E (TAREEAERARRKGGY-amide)	13716	42.5
F (TAAEEAERARRKGGY-amide)	13982	43.4
G (TEAEAAELKARLKGGY-amide)	12339	37.7
H (TNEEAARAALAKKGGY-amide)	12995	39.7
O13 (ac-REEEERRRRLGGY-amide)	18430	58.2
O14 (ac-DRKREEEERRRGGY-amide)	17730	55.0
O15 (ac-DRLLEELLRLLGGY-amide)	10874	33.2
O16 (ac-DEERERLELLLRLGGY-amide)	18298	55.2

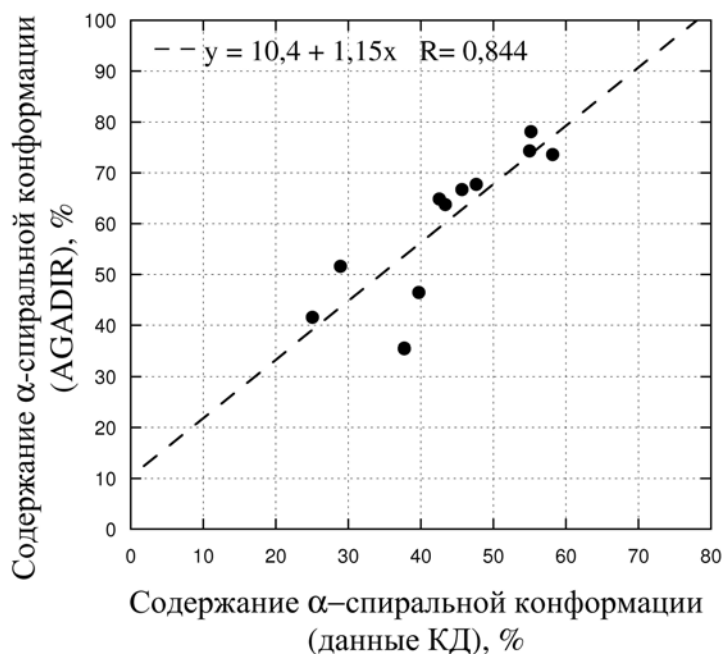
^аСпектры КД регистрировались при стандартной температуре 50°C в 5 мМ буфере TES-NaOH (pH 7.5) при концентрации пептида приблизительно 10 μ M. Содержание спиральной

конформации вычислялось на основе измерения средней эллиптичности (θ_{222}), измеренной при длине волны 222 нм.

Стандартные алгоритмы интерполяции библиотеки программ IMSL (Visual Numerics Inc., USA) использовались для вычислений кубических сплайнов и их аналитических производных во всех точках действительной оси. Сплайны, полученные в соответствии с этой процедурой, являются непрерывно дифференцируемыми функциями с хорошо выделенными энергетическими минимумами в точках целых чисел действительной оси, где они имеют истинные значения энергетических параметров модели AGADIR и нулевые градиенты.

Чтобы подтвердить справедливость теоретических расчетов, были синтезированы 12 хорошо растворимых в воде пептидов с оптимизированными последовательностями и измерено их содержание α -спиральной конформации (САК) с помощью стандартных методов кругового дихроизма (КД). Полученные спектры КД всех пептидов показали типичные характеристики α -спирали. Рис. 6 показывает корреляцию между предсказаниями теоретической модели AGADIR и результатами измерений КД для восьми синтезированных нами пептидов с оптимизированными аминокислотными последовательностями.

Рисунок 6. Корреляция между теоретическими расчетами (AGADIR) и экспериментальными данными (КД) по измерению содержания α -спиральной конформации для серии коротких пептидов с оптимальными аминокислотными последовательностями.



Как видно из рис. 6, имеется высокая корреляция между экспериментальными данными и расчетами, сделанными с помощью модели AGADIR. Однако, предсказания теоретической модели несколько переоценивают содержание α -спирали в этих пептидах, что означает необходимость дальнейшего усовершенствования набора параметров модели. Тем не менее, очевидно, что с имеющимся в настоящее время набором параметров и эффективным методом

глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей разработанный нами подход способен эффективно искать пептиды с близкими к оптимальным аминокислотными последовательностями.

Глава 7. Рациональное конструирование термостабильных мутантов глюкоамилазы из гриба *Asp. awamori*

Глюкоамилаза (КФ 3.2.1.3, 1,4- α -D-глюкан-глюкогидролаза) из мицелиального гриба *Asp. awamori* последовательно отщепляет в процессе реакции гидролиза глюкозные остатки с невосстанавливающих концов крахмала, гликогена, мальтоолигосахаридов. Фермент широко распространен в природе, как у прокариот, так и у эукариот. В 1973 г. корпорация Clinton Corn (США) внедрила технологию получения фруктозы и этанола из кукурузного крахмала - наиболее крупномасштабный биотехнологический процесс, существующий в мире в настоящее время (Б. Глик, Д. Пастернак (2002) “Молекулярная биотехнология”. Москва, Мир). Одной из нерешенных проблем является недостаточная термостабильность глюкоамилазы. Поэтому стадия гидролиза мальтоолигосахаридов глюкоамилазой идет в течение нескольких суток при пониженной, по сравнению с первой стадией, температуре 55–60°C. Энергия, затрачиваемая на охлаждение сиропа после первой стадии до 60°C, а также необходимость занятия производственных мощностей в течение длительного времени практически удваивают себестоимость продукта. Получение термостабильной мутантной глюкоамилазы из гриба *Asp. awamori*, способного работать при 95°C и выше, позволило бы сократить целую стадию в этом биотехнологическом процессе, значительно увеличить скорость гидролиза, уменьшить требуемое время и потребляемые ресурсы и, таким образом, значительно снизить себестоимость конечного продукта. Делались неоднократные попытки получить термостабильную глюкоамилазу из природных источников или с помощью точечных аминокислотных замен, стабилизирующих ее пространственную структуру (Sauer et al. (2000) *Biochim Biophys Acta* 1543(2): 275-293). Однако получить достаточно термостабильный фермент до сих пор не удалось. В работе мы попытались создать более термостабильные формы этого фермента с помощью аминокислотных замен, стабилизирующих одну из α -спиралей этого белка и исследовать их активность при повышенных температурах.

В литературе было показано, что различные элементы вторичной структуры вносят неодинаковый вклад в общую термостабильность глюкоамилазы. В частности, α -спираль “D” является одним из наиболее термочувствительных элементов вторичной структуры глюкоамилазы (С. Ford (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10(4): 353-357). Поэтому дальнейшие

термостабилизирующие модификации глюкоамилазы проводили в α -спирали “D” этого фермента.

В кристаллической структуре глюкоамилазы α -спираль “D” имеет длину 20 аминокислотных остатков (номера аминокислотных остатков белка от 125 до 145) в последовательности RDGPALRATAMIGFGWLLDN, включая два концевых остатка в положениях N-сар и C-сар. Ряд остатков в этой последовательности редко встречаются в белковых α -спиралях в связи с тем, что они либо имеют высокие потери энтропии при встраивании в α -спираль (G127, I136, G137 и G139), либо стерически препятствуют соседним остаткам находиться в α -спирали (P128). Поэтому замена этих остатков на более склонные к образованию α -спиралей (например Ala и Leu) может значительно усилить конформационную стабильность этой α -спирали и, соответственно, термостабильность всего белка. Кроме того, известно, что замена A246C увеличивает термостабильность белка на 4°C и является одной из наиболее термостабилизирующих точечных замен в этом белке, найденных до сих пор. Предполагается, что этот эффект связан с созданием искусственного дисульфидного моста (C246-C320) с единственным свободным остатком C320 в этом белке.

Табл. 3. Константы термоинактивации для различных мутантных форм и глюкоамилазы дикого типа (WT) из *Asp. awamori**

Температура (°C)	WT (сек ⁻¹)	Мутант M3 G137A & A246C (сек ⁻¹)	Мутант M7 G127A & P128A (сек ⁻¹)	Мутант M9 G127A & P128A & G139A & I136L (сек ⁻¹)
65	0.0004	0.0002	0.0014	0.0012
68	0.0008	0.0003	0.0042	0.0021
70	0.0019	0.0011	0.0073	0.0022
72	0.0039	0.0021	не активен	0.0048
75	0.0107	0.0058		0.0111
80	не активен	0.0271		не активен

В работе мы конструировали, клонировали, экспрессировали в *Saccharomyces cerevisiae* и биохимически исследовали несколько мутантов этого белка, полученных с помощью серии последовательных аминокислотных замен в α -спирали “D” глюкоамилазы дикого типа. Все выбранные нами аминокислотные замены предназначались для стабилизации этой α -спирали за счет усиления так называемых внутренних α -спиральных СТ ее аминокислот, а также устранения возможных стерических затруднений, связанных с присутствием аминокислотных остатков пролина в положении N2.

Изменения термостабильности белка характеризовались общепринятым в этой области подходом с помощью измерения температурных зависимостей констант термоинактивации. Результаты этих исследований представлены в табл. 3. Наиболее термостабильным является двойной мутант M3. Этот фермент единственный сохраняет остаточную активность при 80°C. Мутант M7, имеющий две замены в α -спирали “D” G127A и P128A, не дал ожидаемого увеличения термостабильности глюкоамилазы. Хотя эта форма глюкоамилазы и сохраняет остаточную активность при 70°C, его константы инактивации в 3-5 раз выше, чем у белка дикого типа в области температур от 65°C до 70°C. Однако, введение в эту мутантную форму дополнительной замены G139A (мутант M8) в значительной мере компенсирует дестабилизацию, внесенную G127A и P128A. Например, при 70°C константа инактивации мутанта M8 понизилась в 2.4 раза по сравнению с мутантом M7. Дополнительная замена I136L (мутант M9) привела к еще большей термостабилизации глюкоамилазы, при этом его константа термоинактивации становится практически равной константе термоинактивации глюкоамилазы дикого типа. На основании полученных данных можно заключить, что, в отличие от аминокислотной замены P128A, замены G137A, A246C, I136L и G139A имеют сильный термостабилизирующий эффект. Можно ожидать, что комбинированная мутантная форма фермента, содержащая все 4 стабилизирующие замены, будет иметь значительно повышенную термостабильность.

Общие выводы

1. Разработан новый подход для молекулярного моделирования гидратации белков, позволяющий эффективно вычислять основные составляющие свободной энергии гидратации для белков в произвольной конформации. Показано, что атомарные параметры гидратации полярных и заряженных атомов зависят от их поверхности, доступной растворителю. Получены аналитические выражения для этих зависимостей.
2. Экспериментально показано, что структурные тенденции аминокислот, влияющие на стабильность α -спиралей, зависят от их типа и позиции в α -спиралях. Величина эффекта в

некоторых случаях может составлять до 1.1 ккал/моль. Показано, что позиционный эффект определяется комбинацией трех физических факторов: конфигурационной энтропией, гидратацией и количеством ван-дер-ваальсовых контактов боковых цепей аминокислот.

3. Разработан новый метод глобальной оптимизации для конструирования аминокислотных последовательностей α -спиралей, имеющих близкую к максимально возможной конформационную стабильность. Данные КД-спектроскопии показали, что содержание α -спиральной конформации в пептидах длиной 10-13 остатков может достигать 70-75%.

4. Показано, что термостабильность белков RecA из термофильных бактерий связана с конформационной стабильностью их α -спиралей. Проведенный анализ показал, что α -спирали белков RecA из термофильных, мезофильных и психрофильных бактерий (при нормальных температурах функционирования их организмов-хозяев) имеют примерно одинаковый уровень конформационной стабильности.

5. Экспериментально показано, что константа термоинактивации двойного мутанта глюкоамилазы из *Asp. awamori* (G137A и A246C) примерно в 2 раза ниже, чем у белка дикого типа. Кроме того, двойная мутация I136L и G139A в термочувствительной α -спирали D этого фермента имеет значительный термостабилизирующий эффект.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Автором опубликованы 47 работ (17 статей в международных, 12 статей в российских журналах и сборниках и 18 тезисов на всероссийских и международных конференциях):

1. Мазур А.К., Петухов М.Г., Елякова Л.А. Модель пространственного случайного блуждания деполимеразы при взаимодействии с субстратом // Биофизика, – 1988. – Том 33. – С. 417-421.
2. Петухов М.Г., Першин В.Л. АВ INITIO-исследование электронного строения молекулы α -D-глюкозы // Журнал структурной химии, – 1988. – Том 29. – С. 167-168.
3. Петухов М.Г., Дорофеев В.Э., Абагян Р.А., Мазур А.К. Глобальная оптимизация конформационной энергии олигопептидов с помощью Туннельного алгоритма // Биофизика, – 1992. – Том 37. – С. 226-230.
4. Петухов М.Г., Мазур А.К. Моделирование возможных способов связывания субстрата в активном центре α -амилазы A из *Aspergillus oryzae* // Мол. Биол., – 1992. – Том 26. – С. 292-299.
5. Petukhov M.G., Yumoto N., Murase S., Yamamoto H., Tatsu Y., Yoshikawa S. Computer molecular modeling investigation of the conformational properties of the helical part of

- Neuropeptide Y (NPY) substituted at N-terminus // Peptide Chemistry, – ed. Ohno M., Protein Research Foundation – 1994. – P. 401-404.
6. Yumoto N., Murase S., Petukhov M.G., Yamamoto H., Tatsu Y., Taguchi T., Yoshikawa S. Stabilization of alpha-helix in Neuropeptide Y by end capping and helix dipole/charge interaction // Peptide Chemistry, – ed. Ohno M., Protein Research Foundation, – 1994. – P. 429-432.
7. Petukhov M.G., Mazur A.K., Elyakova L.A. Investigation of the conformational properties of a beta-(1-->3) branched beta-(1-->6) heptasaccharide elicitor and its analogues by internal coordinate stochastic dynamics // Carbohydr. Res. – 1995. – Vol. 279. – P. 41-57.
8. Murase S., Yumoto N., Petukhov M.G., Yoshikawa S. Acylation of the alpha-amino group in neuropeptide Y(12-36) increases binding affinity for the Y2 receptor // J. Biochem. (Tokyo), – 1996., – Vol. 119. – P. 37-41.
9. Petukhov M., Yumoto N., Murase S., Onmura R., Yoshikawa S. Factors that affect the stabilization of alpha-helices in short peptides by a capping box. // Biochemistry – 1996. – Vol. 35. – P. 387-397.
10. Petukhov M., Kil Y., Kuramitsu S., Lanzov V. Insights into thermal resistance of proteins from the intrinsic stability of their alpha-helices // Proteins – 1997. – Vol. 29. – P. 309-320.
11. Петухов М.Г., Киль Ю.В., Ланцов В.А. О природе терморезистентности белков: стабильность α -спиралей белков RecA термофильных бактерий // Докл. Акад. Наук –1997. – Том 356. – С. 268-271.
12. Petukhov M., Munoz V., Yumoto N., Yoshikawa S., Serrano L. Position dependence of non-polar amino acid intrinsic helical propensities // J. Mol. Biol. – 1998. – Vol. 278. – P. 279-289.
13. Rizvi T.Z., Petukhov M., Tatsu Y., Yumoto N., Yoshikawa S. Stabilization of helix-turn-helix motif in short peptides // J. Chem. Soc. Pakistan – 1998. – Vol. 20. – P. 137-140.
14. Петухов М.Г., Байтин Д.М., Киль Ю.В., Ланцов В.А. Оптимальная жесткость белковой структуры: три класса жесткости у семейства белков RecA эубактерий // Докл. Акад. Наук. – 1998. – Том 362. – С. 118-121.
15. Petukhov M., Cregut D., Soares C.M., Serrano L. Local water bridges and protein conformational stability // Protein Sci. – 1999. – Vol. 8. – P. 1982-1989.
16. Petukhov M., Uegaki K., Yumoto N., Yoshikawa S., Serrano L. Position dependence of amino acid intrinsic helical propensities II: non-charged polar residues: Ser, Thr, Asn, and Gln. // Protein Sci. – 1999. – Vol. 8. – P. 2144-2150.
17. Chervyakova D., Kagansky A., Petukhov M., Lanzov V. [L29M] substitution in the interface of subunit-subunit interactions enhances Escherichia coli RecA protein properties important for its recombinogenic activity // J. Mol. Biol. – 2001 – Vol. 314. – P. 923-935.

18. Petukhov M., Uegaki K., Yumoto N., Serrano L. Amino acid intrinsic alpha-helical propensities III: positional dependence at several positions of C terminus // *Protein Sci.* – 2002. – Vol. 11. – 766-777.
19. Петухов М., Рычков Г., Сerrano Л. Теоретическое моделирование гидратации белков. // Бреслеровские чтения (2002): Молекулярная генетика, биофизика и медицина сегодня. – ред. Ланцов В. – Издательство ПИЯФ РАН. – 2002. Том 1. – С. 148-168.
20. Bayramov F.B., Toporov V.V., Petukhov M.G., Glazunov E.A., Bairamov B.H. Structural properties and dynamics of low-energy collective excitations of water and lisozyme // *Phys. Stat. Sol. (C)*. – 2004. – Vol. 1. – P. 3134-3137.
21. Petukhov M., Rychkov G., Firsov L., Serrano L. H-bonding in protein hydration revisited // *Protein Sci.* – 2004. – Vol. 13. – P. 2120-2129.
22. Petukhov M., Lebedev D., Shalguev V., Islamov A., Kuklin A., Lanzov V., Isaev-Ivanov V. Conformational flexibility of RecA protein filament: Transitions between compressed and stretched states // *Proteins* – 2006. – Vol. 65. – P. 296-304.
23. Якимов А., Петухов М. Молекулярное моделирование пространственной структуры биомакромолекул с помощью методов интервального анализа и глобальной оптимизации в обобщенных координатах // ИНТЕРВАЛ-06 Всероссийская (с международным участием) конференция по интервальному анализу и его приложениям – издательство Санкт-Петербургского Государственного университета – 2006. – С. 154-157.
24. Rychkov G., Petukhov M. Joint neighbors approximation of macromolecular solvent accessible surface area // *J. Comput. Chem.* – 2007. – Vol. 28. – P. 1974-1989.
25. Петухов М.Г., Лебедев Д.В., Карелов Д.В., Исаев-Иванов В.В. Крупномасштабная конформационная подвижность филамента белка RecA. // Бреслеровские чтения 2 (2006): Молекулярная генетика, биофизика и медицина сегодня. – ред. Ланцов В. – Издательство ПИЯФ РАН – 2007. – Том 1. – С. 99-109.
26. Рычков Г.Н., Петухов М.Г. Теоретическое моделирование гидратации белков, с помощью расчёта площади поверхности доступной растворителю. // там же С. 299-313.
27. Рычков Г.Н., Петухов М.Г. Расчёт площади поверхности биополимеров, доступной растворителю, с помощью объединения пар атомов. // Вестник молодых ученых МГУ "Ломоносов". – Мысль. – 2007. – Том 4. – С. 11-19.
28. Petukhov M., Tatsu Y., Tamaki K., Murase S., Uekawa H., Yoshikawa S., Serrano L., Yumoto N. Design of stable alpha-helices using global sequence optimization // *J. Pept. Sci.* – 2009. – Vol. 15. – P. 359-365.
29. Суржик М.А., Чуркина С.В., Шмидт А.Е., Швецов А.В., Кожина Т.Н., Фирсов Д.Л., Фирсов Л.М., Петухов М.Г. Влияние точечных аминокислотных замен во внутренней α -

спирали на термостабильность глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* x100 // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – принята для публикации.

30. Petukhov M, Lebedev D, Karelov D, Glazunov E, Kuklin A, Lanzov V, Isaev-Ivanov V. Molecular Mechanisms of a Large Scale Conformational Flexibility and Thermostability in the RecA Protein. In: Solov'yov A, editor. Europhysics conference abstracts; St. Petersburg (Russia) June 3-7, 2008. European Physical Society. p 97.

31. Rytchkov GN, Bobrov KS, Borisova AS, Shabalin KA, Petukhov MG, Kulminskaya AA. Modification of regiospecificity of the alpha-galactosidase from *Thermotoga maritima* towards pharmaceutically important globotriose. 2008; St.-Petersburg, Russia June 16-18, 2008. Publishing House of St.-Petersburg State Polytechnical University. p 173-174.

32. Шмидт АЕ, Чуркина СВ, Суржик МА, Кожина ТН, Петухов МГ, Фирсов ЛМ. Новый способ конструирования термостабильной глюкоамилазы. 9 декабря 2008 г.; Санкт-Петербург. Издательство Санкт-Петербургского Политехнического университета. p 133-134.

33. Илатовский А.В., Петухов М.Г. Расчет спектров МРН для супернуклеосомной структуры хроматина. 9 декабря 2008 г.; Санкт-Петербург. Издательство Санкт-Петербургского Политехнического университета. p 115-116.

34. Якимов, А.П., Петухов, М.Г. „Метод поиска низкоэнергетических конформаций биомолекул с гарантированной сходимостью”, Материалы докладов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов”. (ред. И.А. Алешковский, П.Н. Костылев), Издательство МГУ; СП МЫСЛЬ, Москва, 2008г., стр. 21-22.

35. Швецов, А.В., Петухов, М.Г., “Моделирование конформационной подвижности филамента белка RecA”, Материалы докладов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов”. (ред. И.А. Алешковский, П.Н. Костылев), Издательство МГУ; СП МЫСЛЬ, Москва, 2008г., стр. 19-20.

36. Platovskiy A., Petukhov M., “Statistical analysis of GC-content in promoter areas of complete bacterial genome”, IV Moscow International Congress “Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development”, Moscow, , March, 2007, P. 397.

37. Рычков Г.Н., Петухов М.Г., Расчёт площади поверхности биополимеров, доступной растворителю, с помощью объединения пар атомов. XIV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов”, Москва, апрель, 2007г., том 1, стр. 51

38. Рычков Г.Н., Петухов М.Г., “Новый непараметрический метод приблизительного вычисления площади поверхности биополимеров, доступной растворителю (ПДР)”, научная конференция “Современные проблемы науки о полимерах”, Сборник тезисов, Санкт-Петербург, 2007г., стр. 84

39. Илатовский А.В., Петухов М.Г., “Моделирование супернуклеосомной структуры хроматина”, материалы политехнического симпозиума “Молодые ученые – промышленности северо-западного региона”, Санкт-Петербург, 2007г. стр. 119.
40. Швецов А.В., Петухов М.Г., “Моделирование конформационной подвижности белка RecA”, материалы политехнического симпозиума “Молодые ученые – промышленности северо-западного региона”, Санкт-Петербург, 2007г., стр. 128.
41. Якимов А.П., Петухов М.Г., “Моделирование пространственных структур биомакромолекул методами математики надежных вычислений”, материалы политехнического симпозиума “Молодые ученые – промышленности северо-западного региона”, Санкт-Петербург, 2007г., стр. 132.
42. Petukhov M., Lebedev D., Shalguev V., Islamov A., Kuklin A., Lanzov V., Isaev-Ivanov V. M., “Conformational flexibility of RecA protein filament: transitions between compressed and stretched states”, XIII International Conference on Small-angle Scattering, Kyoto, Japan, July, 2006, P. 31.
43. Petukhov M., Lebedev D., Shalguev V., Islamov A., Kuklin A., Lanzov V., Isaev-Ivanov V. “Investigations of the large scale flexibility in RecA protein filament by small angle neutron scattering (SANS)”, 5-th Workshop on Investigations at the IBR-2 Pulsed Reactor, Dubna, Russia, July, 2006, P. 60.
44. Рычков Г.Н., Петухов М.Г., “Расчёт вероятностей образования водородных связей при гидратации белка на основе поверхности, доступной растворителю”, “Биология – наука XXI века”: 9-ая международная Пушинская школа-конференция молодых учёных, сборник тезисов, Пушино, апрель, 2005г., стр. 330.
45. Рычков Г.Н., Петухов М.Г., ”Новый метод расчёта невалентных взаимодействий растворителя с внутренними атомами глобулярных белков”, “Молодые учёные промышленности Северо-западного региона”: политехнический симпозиум, сборник тезисов, Санкт-Петербург, ноябрь, 2004г., стр. 72.
46. Рычков Г.Н. и Петухов М.Г. “Новый метод приблизительного расчёта площади поверхности белка, доступной растворителю”. “Биология – наука XXI века”: 8-ая международная Пушинская школа-конференция молодых учёных (Пушино). Сборник тезисов, 2004г., стр. 242.
47. Rychkov G. and Petukhov M. Based on approximate accessible surface model of protein hydration // 13-th European Students' Conference 2002, Humbolt University of Berlin, 2002, P. 21.