

На правах рукописи

ФРЕНКЕЛЬ Захар Михайлович

ИЗУЧЕНИЕ САМООРГАНИЗАЦИИ БИОПОЛИМЕРОВ МЕТОДОМ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Специальность 01.04.07 – Физика конденсированного состояния

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург 2002

Работа выполнена в Санкт-Петербургском государственном политехническом
университете

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор А.И. Мелькер

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор А.Л. Тимковский

кандидат физико-математических наук,
доцент С.Н. Романов

Ведущая организация: институт Цитологии РАН
(Санкт-Петербург)

Защита состоится “__” _____ 2003 г. в ____ часов

на заседании диссертационного совета Д 212.229.05

в Санкт-Петербургском государственном политехническом университете по

адресу: 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке СПбГПУ

Автореферат разослан “__” _____ 2002 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 212.229.05

Ю.Ф. Титовец

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Предсказание нативной конформации биополимеров, а также понимание путей достижения этой конформации и ее изменения в процессе функционирования – является важнейшей проблемой молекулярной биологии. Экспериментально нативную конформацию можно определить с помощью рентгеноструктурного анализа, однако эксперимент позволяет судить о динамике процесса лишь косвенно. Поэтому структурную организацию изучают как аналитически, так и методами компьютерного моделирования.

Преимущество моделирования состоит в том, что он позволяет получать такую информацию о процессе, которая, как правило, недоступна в реальном эксперименте. Это в свою очередь дает широкую возможность для перехода от феноменологического описания к созданию строгой физической теории.

Цель работы.

1. Разработать методику и программное обеспечение для изучения самоорганизации биополимеров (белков и нуклеиновых кислот).
2. Изучить процессы формирования структур полипептидов и нуклеиновых кислот, выяснив, какие факторы и как влияют на этот процесс, а затем, установить критерии, при которых сформированная структура биополимера соответствует нативной конфигурации.
3. Дать аналитическое описание механизма формирования этих структур.
4. Построить аналитическую модель функционирования биополимеров в живой клетке.

Научная новизна работы заключается в том, что в ней впервые

- методом молекулярной динамики исследовано сворачивание реальных биополимеров в глобулу.
- предложен механизм сворачивания и поддержания стабильности глобулы, и построена феноменологическая теория этого процесса.

- дано аналитическое описание механизма клеточного деления.

Практическая ценность работы

В результате моделирования были найдены критерии формирования глобулярной конформации, что является необходимым этапом на пути к пониманию реального поведения биомолекулы в клетке и предсказанию нативной структуры. Предложенная модель клеточного деления дает наглядную и количественную оценку вклада любого компонента системы в регуляцию клеточного цикла млекопитающих. Разработанные методика и программное обеспечение могут быть использованы не только для дальнейшего исследования рассмотренных в данной работе белков и нуклеиновых кислот, но и для других более сложных систем.

Основные положения, выносимые на защиту

- методика моделирования биополимеров;
- самоорганизация полипептидов, составленных из одного типа аминокислот, приводящая к появлению разных типов глобул;
- самоорганизация реального белка – миоглобина, роль спиральности при самоорганизации белков;
- модель системы регуляции клеточного деления в виде биологического нелинейного осциллятора с трением.

Апробация работы. Результаты диссертации доложены:

1. На Всероссийской конференции, посвящённой столетию энзимологии. СПбГУ 7-8 апреля 1998 г.
2. На конференции, посвящённой неделе науки, в СПбГТУ 7-8 декабря 1998 г.
3. На третьей международной конференции «Новые подходы к высоким технологиям 99. Неразрушающие методы исследования и компьютерные методы в науке и технике». – NDTCS-99 (Санкт-Петербург, Россия, 13-18 июня 1999 г.)
4. На четвёртой международной конференции «Новые подходы к высоким технологиям 2000. Неразрушающие методы исследования и компьютерные

методы в науке и технике». – NDTCS-2000 (Санкт-Петербург, Россия, 12-17 июня 2000 г.)

5. На международной конференции Polymerwerkstoffe 2000 (университет Мартина Лютера, Германия, 25-27 сентября 2000 г.)

6. На пятой международной конференции «Новые подходы к высоким технологиям 2001. Неразрушающие методы исследования и компьютерные методы в науке и технике». – NDTCS-2001 (Санкт-Петербург, Россия, 12-17 июня 2001 г.)

7. На международной школе Physics of Biomolecules and Cells (Франция, Лезуш, 2-26 июля 2001г.)

8. На шестой международной конференции «Новые подходы к высоким технологиям 2002. Неразрушающие методы исследования и компьютерные методы в науке и технике». – NDTCS-2002 (Санкт-Петербург, Россия, 10-16 июня 2002 г.)

9. На международной конференции Polymerwerkstoffe 2002 (университет Мартина Лютера, Германия, 25-27 сентября 2002 г.)

а также на семинарах кафедры «Биофизика» и «Физика металлов и компьютерных технологий в материаловедении» Санкт-Петербургского государственного Политехнического университета и Института Физики .сложных систем Макса Планка в Дрездене, Германия.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ.

Структура и объём диссертации: Диссертация состоит из введения, пяти глав, перечня основных результатов и выводов. Она содержит 230 страниц машинописного текста, 88 рисунков и список использованной литературы из 109 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность и сформулирована цель исследования, описана структура диссертации, раскрыта научная новизна и практическая

значимость полученных результатов, приведены основные положения, выносимые на защиту.

БЕЛКИ И НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ – ВАЖНЕЙШИЕ БИОПОЛИМЕРЫ

Рассмотрены основные представления об особенностях строения и физических свойствах белков и нуклеиновых кислот, а также о механизме их сворачивания в нативную конформацию и о стабилизирующих её силах. Приведён обзор современных методов компьютерного моделирования, и в особенности методов молекулярной динамики, применяемых в физике полимеров. Кратко рассмотрено функционирование биополимеров в клетке.

На основе анализа литературных данных сформулированы задачи работы.

МЕТОДИКА КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Моделирование самоорганизации биополимеров проводилась на основе программы Molecula, разработанной ранее на кафедре Физики металлов и компьютерных технологий в материаловедении (Соловьёв Д.В. Молекулярно-динамические исследования деформации полиэтилена: Дис. на соиск. уч. ст. к. ф.-м. н. / СПбГТУ. СПб, 1998. 117с.). В эту программу были внесены дополнения, ускоряющие её работу, а также добавлены блоки, позволяющие задавать начальные конформации и анализировать полученные структуры биополимеров.

САМООРГАНИЗАЦИЯ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПОЧЕК, СОСТАВЛЕННЫХ ИЗ ОДНОГО ТИПА АМИНОКИСЛОТ

Результаты компьютерного моделирования сворачивания полимеров, составленных из одного типа аминокислот, показали, что можно выделить два основных механизма сборки глобулы. Первый, возникающий при высокой энергии начального состояния (за счёт сильной деформации валентных связей и углов), заключается в формировании крупных петель в центре молекулы, в которые собирается вся цепочка. При втором, возникающем из

отрелаксированного начального состояния, сворачивание происходит вдоль всей цепи молекулы, с образованием неупорядоченной вторичной структуры. В дальнейшем глобула формируется либо за счет продолжения роста и объединения петель по всей длине, либо за счёт складывания сформированной вторичной структуры. Сформированные глобулы можно разделить на устойчивые, неустойчивые и частично устойчивые.

На механизм сворачивания и устойчивость глобулы влияют как энергия системы, так и структура бокового радикала. При понижении начальной энергии, глобула из неустойчивой (или частично устойчивой) переходит в устойчивую, и изменяется механизм сворачивания (от сворачивания в центре, к сворачиванию по всей длине). При одной и той же температуре глобулы одних полиаминокислот устойчивые, а других неустойчивые.

Детальное изучение сворачивания было проведено для полиаланина, состоявшего из ста аминокислот (рис.1-2). Расчёты были сделаны на временном интервале до 170 пс и в процессе сворачивания снимались временные зависимости различных характеристик.

Обнаружено, что возможна ситуация, когда температура молекулы (рассчитанная как средняя кинетическая энергия) падает, а среднеквадратичные отклонения атомов из положения равновесия (и, соответственно, амплитуды колебаний) и валентных углов растут. В связи с этим, была разработана методика разделения скоростей на две составляющие.

$$V_i = V_{др i} + V_{кол i}.$$

Здесь $V_{др i}$ – скорость дрейфа связана с движением фрагмента молекулы как целого, $V_{кол i}$ связана с колебаниями атома около положения равновесия. Скорость дрейфа меняется значительно медленнее, чем колебательная составляющая, поэтому выбиралось такое время усреднения, при котором выполнялись условия $\langle V_{кол i} \rangle_t \cong 0$ и $\langle V_{др i} \rangle_t \cong V_{др i}$. При этом $V_{кол i} = V_i - V_{др i}$.

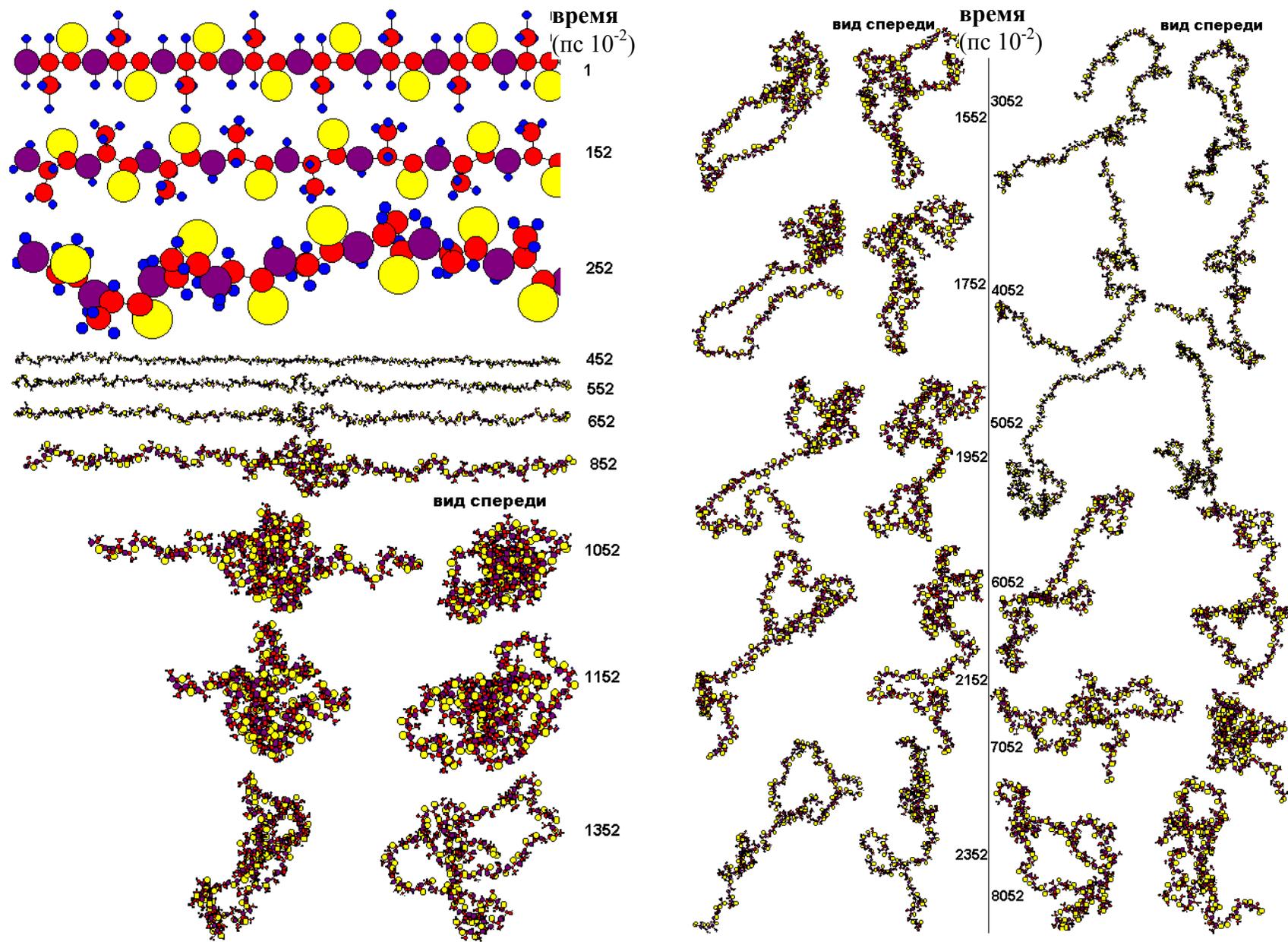


Рис. 1. Самоорганизация полиаланина из начальной линейной конфигурации. (Неустойчивая глобула).

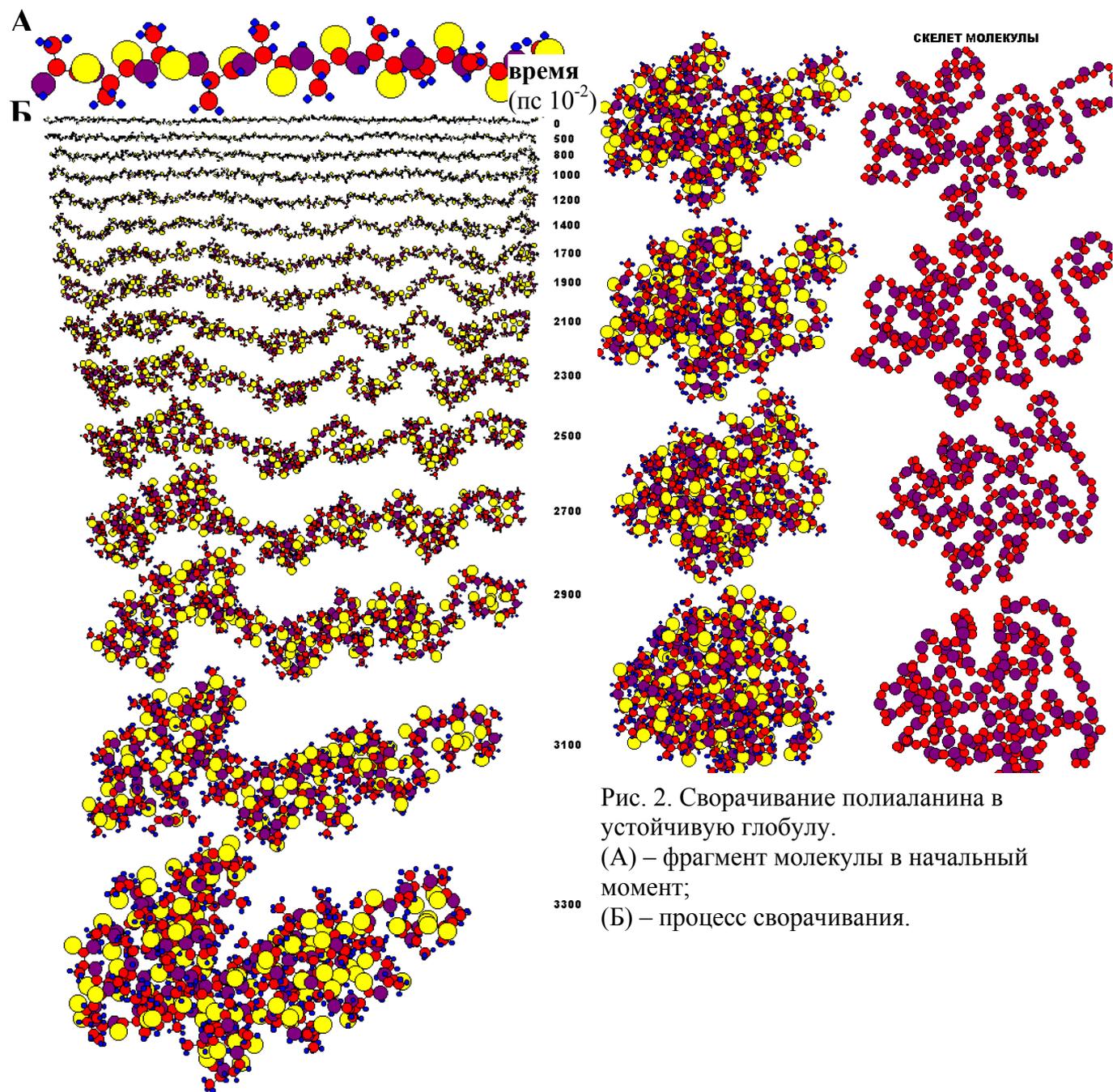


Рис. 2. Сворачивание полиаланина в устойчивую глобулу.

(А) – фрагмент молекулы в начальный момент;

(Б) – процесс сворачивания.

В процессе самоорганизации можно выделить две составляющие: первая протекает независимо от объёмных взаимодействий, а вторая связана с объёмными взаимодействиями. В связи с этим была рассмотрена система, где присутствует только первая составляющая, а объёмные взаимодействия вообще отсутствуют. Сворачивание полиаланина при отсутствии объёмных взаимодействий происходило в виде затухающих колебаний с увеличением их периода (рис. 3). Временные зависимости дрейфовой и колебательной составляющей кинетической энергии показаны на рис. 4. Поведение осциллирующей составляющей дрейфовой кинетической энергии описывается уравнением Матье с трением

$$\frac{d^2x}{dt^2} + 2\beta \frac{dx}{dt} + \omega_0^2(1 - h \sin(\Omega t))x = 0,$$

в котором роль внешней силы в данном случае играют продольные колебания. Взаимодействие линейных продольных колебаний и нелинейных поперечных колебаний ведёт к параметрическому резонансу поперечных колебаний, образованию поперечных волн с большой амплитудой приводят, к сжатию, и в конечном итоге к сворачиванию.

Модель, объясняющая природу силы трения, заключается в следующем. Внешний источник передает энергию крупномасштабному движению, затем энергия переходит в мелкомасштабные флуктуации. На ранней стадии крупномасштабное движение происходит вдоль оси начальной ориентации. Затем, после перехода к ламинарному периодическому движению, в перпендикулярном направлении. Этот процесс повторяется с продолжающимся убыванием размеров крупномасштабного движения. При этом роль мелкомасштабных флуктуаций играют изменения торсионных углов.

С ростом трения движение перестаёт быть периодическим, что соответствует ситуации, когда учтены объёмные взаимодействия. В этом случае у системы появляются дополнительные степени свободы, и энергия дрейфового движения быстрее переходит в колебательную.

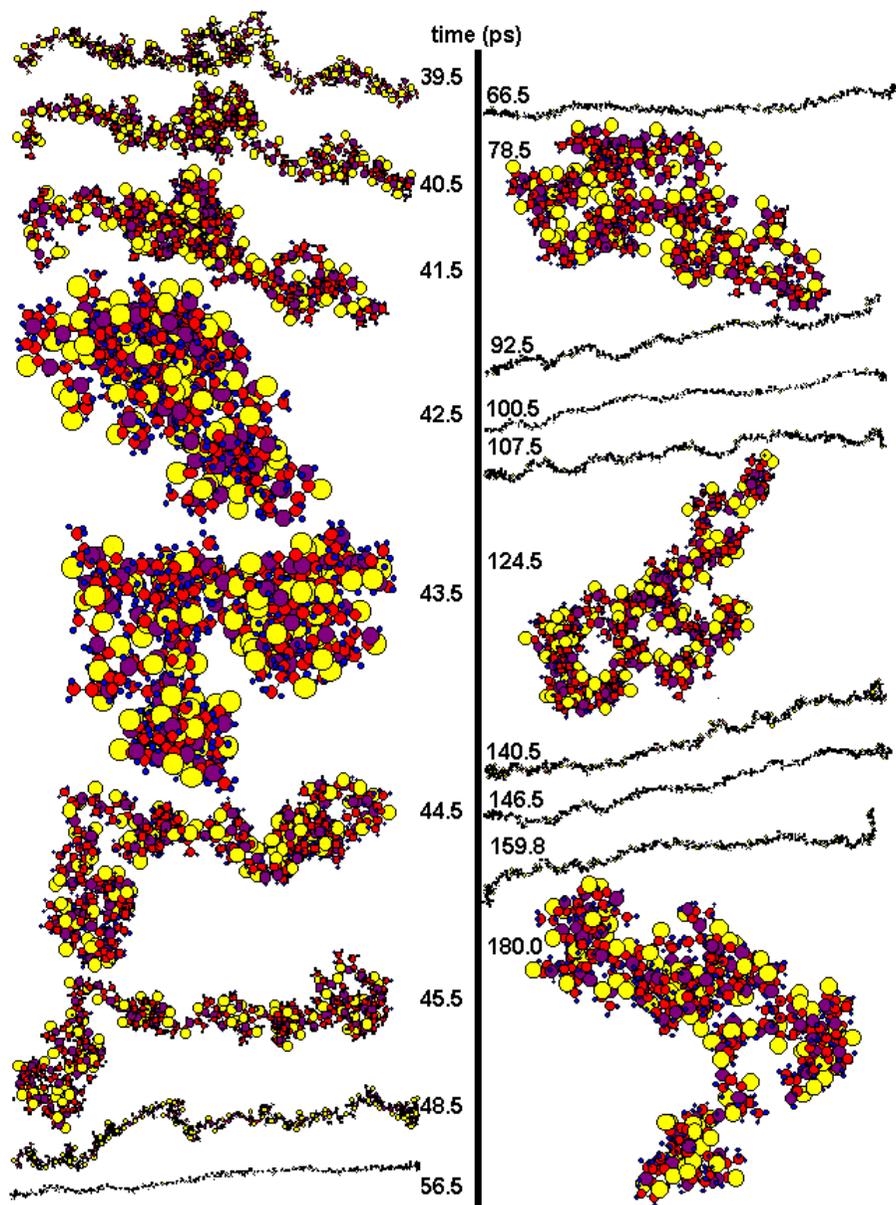
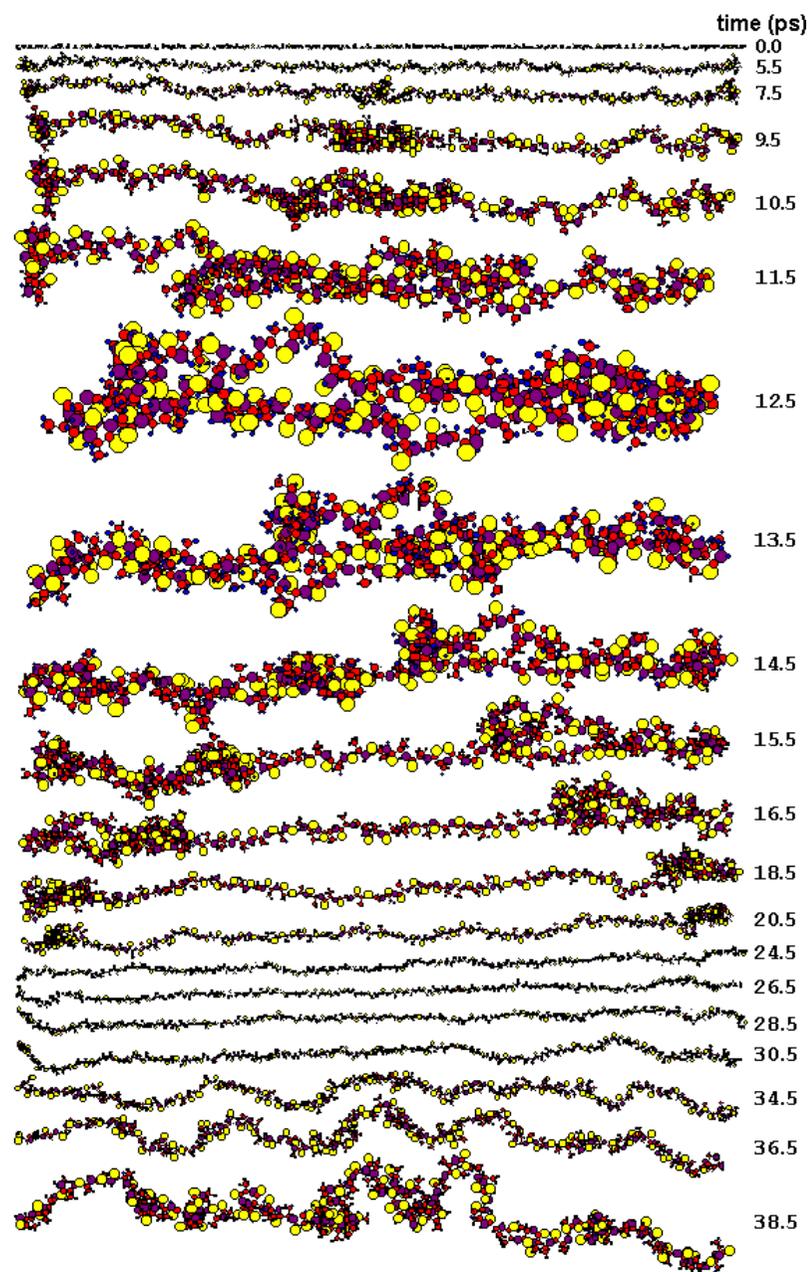


Рис. 3. Самоорганизация молекулы полиаланина из начальной линейной конфигурации без учёта объёмных взаимодействий.

САМООРГАНИЗАЦИЯ РЕАЛЬНЫХ БЕЛКОВ.

Для исследования был выбран белок с известной структурой – миоглобин, и для него было изучено сворачивание при различных температурах. Самоорганизация миоглобина протекала аналогично самоорганизации молекул, составленных из одного типа аминокислот. Варьирование начальных условий и потенциалов взаимодействий позволило найти критерии, при которых рассчитанная конформация хорошо совпадает с экспериментальной.

Сворачивание миоглобина при условии стабильности спирали (рис. 4-5) отличается от всех процессов наблюдавшихся ранее для полипептидов, составленных из одного типа аминокислот. Начальная спираль разламывается на несколько фрагментов, которые сохраняют свою спиральность на протяжении всего процесса самоорганизации. Полученная глобула состоит из спиральных доменов, таких же как в нативной структуре белка (рис. 5). При этом места изломов совпадают с данными эксперимента.

МОДЕЛИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ

Модель самоактивирующегося гена описывается следующей схемой:



где D – регуляторная последовательность ДНК гена E₁, E₁ – белок активатор синтеза, C₁ – комплекс E₁-ДНК, AA – аминокислоты.

Этой схеме соответствует система уравнений

$$\frac{dC_1}{dt} = k_1 * (D_0 - C_1) * E_1 - k_2 * C_1$$

$$\frac{dE_1}{dt} = - k_1 * (D_0 - C_1) * E_1 + k_2 * C_1 - k_{d1} * E_1 + k_{s1} * C_1$$

$$(D_0 = C_1 + D = \text{const})$$

или, в безразмерном виде

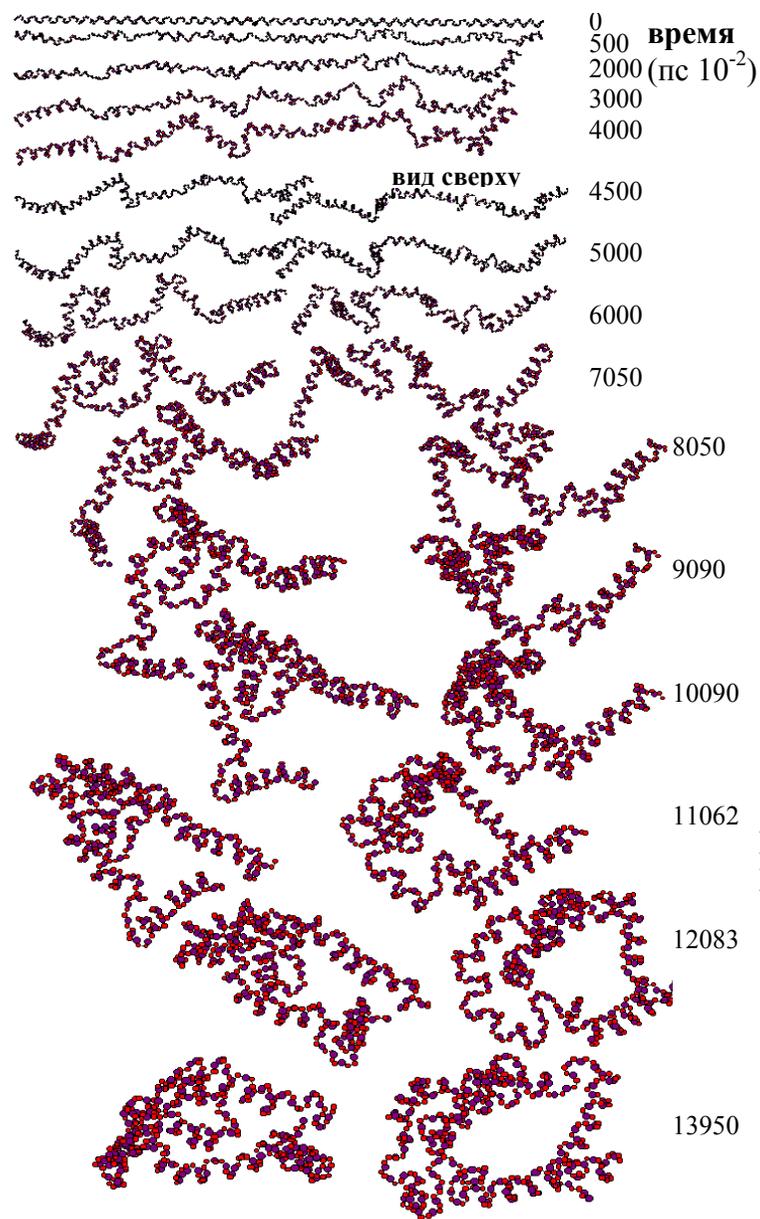


Рис. 4. Сворачивание миоглобина при условиях стабильности спиралей

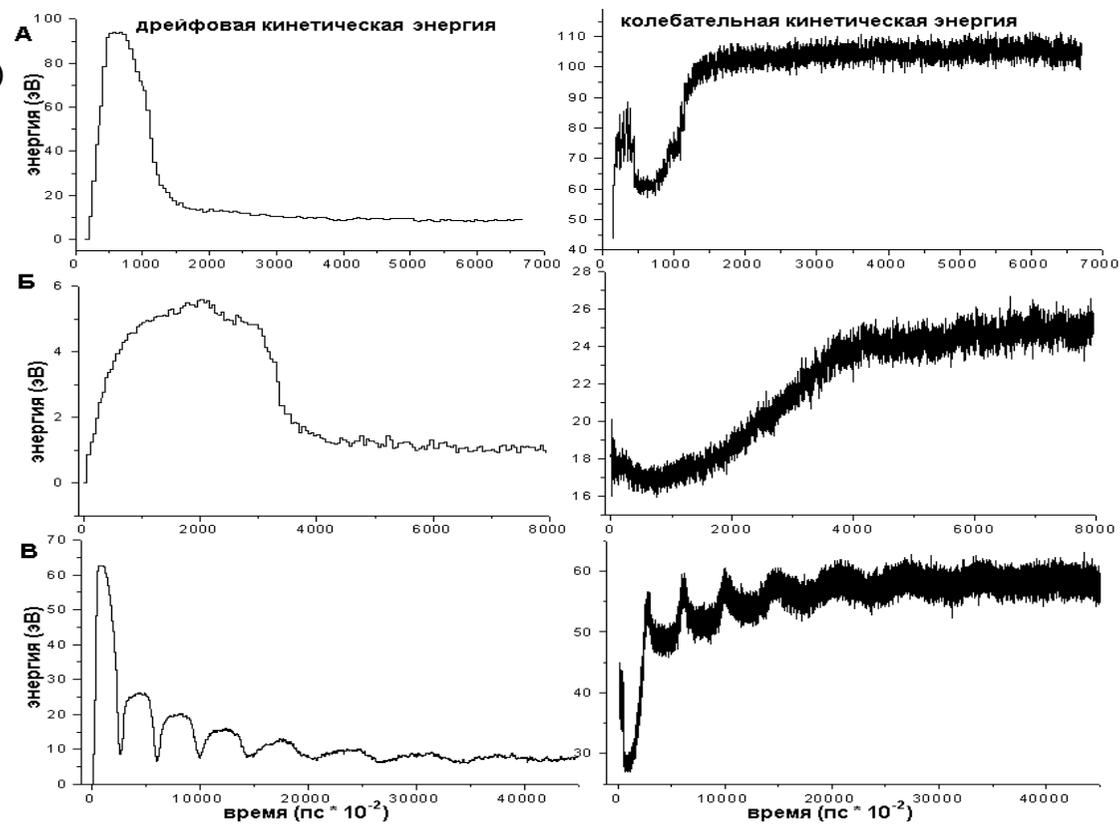


Рис. 3. Две составляющие кинетической энергии. А. Неустойчивая глобула. Б. Устойчивая глобула. В. Сворачивание без объёмных взаимодействий.

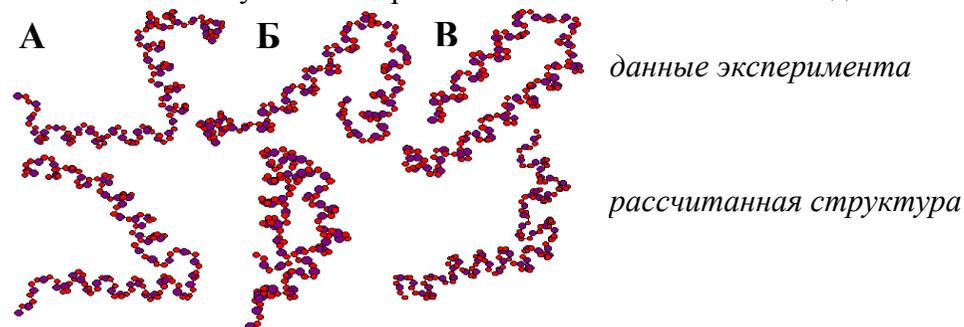


Рис. 5. Сравнение белкового скелетов рассчитанного миоглобина с данными рентгеноструктурного анализа. А. 1-50 аа; Б. 50-100 аа; В. 100-152аа.

$$\frac{dx}{d\tau} = -(\kappa_d + 1)x + (\kappa + \kappa_s)y + x^2 y$$

$$\frac{dy}{d\tau} = x - \kappa y - x^2 y$$

Характеристическое уравнение для определения устойчивости $\omega^2 + 2p\omega + q = 0$ является тем же самым, что и для линейного (гармонического) осциллятора с трением. Для нелинейного, или ангармонического осциллятора, это уравнение имеет вид

$$\omega^2 + 2p\omega - F(x) = 0,$$

где $F(x)$ – сила, равная нулю в равновесных состояниях. Таким образом

$$F \sim (x - x_1)(x - x_2) = x^2 \left(x - \left(\frac{\kappa_s}{\kappa_d} - \kappa \right) \right) = x^2 \left(x - \frac{q}{\kappa_d} \right)$$

Введём потенциал

$$U(x) = \kappa_d \frac{x^3}{3} + q \frac{x^2}{2}, \text{ для которого } F(x) = - \frac{dU(x)}{dx}.$$

Таким образом, мы поставили в соответствие системе двух нелинейных кинетических уравнений одно уравнение ангармонического осциллятора, поведение которого определяется знаком параметра q (рис. 6). Дальнейший анализ системы регуляции проводился подобным образом, при постепенном добавлении к саморегулирующемуся гену различных компонент. Конечный потенциал имел вид

$$U(x, \kappa_{rb}) = \kappa_f \kappa_d (1 + \kappa \kappa_{rb}) \frac{x^4}{4} + (\kappa_d (1 + \kappa \kappa_{rb}) + \kappa_f (q + \beta \kappa_d)) \frac{x^3}{3} + \\ + (q + \beta \kappa_d + \kappa \kappa_d \kappa_{p130} e^4 - \kappa_f \beta \kappa_s) \frac{x^2}{2} - \beta \kappa_s x$$

Данная форма потенциала говорит о том, что система имеет два энергетических минимума, соответствующих состоянию покоя и деления. Параметры потенциала отражают вклады различных компонент в регуляцию клеточного цикла. При этом любой из минимумов может увеличиваться, уменьшаться или

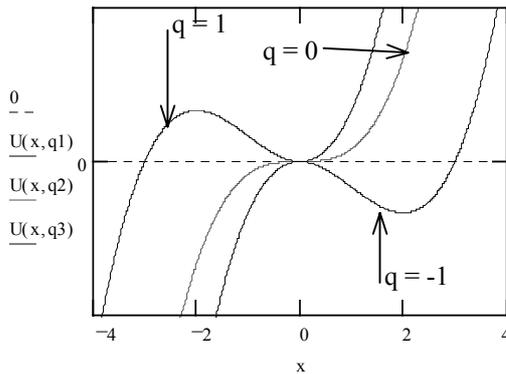


Рис. 6. $U(x, q_i) = \kappa_d * x^3 / 3 + q_i * x^2 / 2$, $\kappa_d = 1$.

а) Если $q < 0$, система имеет две точки покоя в неотрицательной области: $x=0$, неустойчивую и соответствующую максимуму потенциальной энергии и $x=-q/\kappa_d$, устойчивая и соответствующая минимуму потенциальной энергии.

б) При $q \geq 0$, система имеет только одну неотрицательную точку покоя – $x=0$, которая является устойчивой.

пропадать совсем. Это соответствует разным процессам: дифференцировке клетки, её пролиферации или трансформации.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Разработано программное обеспечение для исследования формирования структур белков и нуклеиновых кислот.
2. Методом молекулярной динамики исследовано сворачивание биополимеров в глобулу. Выявлено два вида сворачивания полипептидов: собирание к центру и образование складок по всей длине. Реализация того или иного способа зависит от исходной конформации молекулы и типа бокового радикала. При этом могут образовываться три типа глобул (неустойчивая, устойчивая и частично устойчивая).
3. Показано, что кинетическая энергия молекулы во время сворачивания состоит из двух частей: кинетической энергии дрейфа и кинетической энергии колебательного движения атомов. Предложен метод выделения кинетической энергии колебательного движения для оценки истинной температуры молекулы.
4. Построена феноменологическая теория сворачивания. Показано, что энергия крупномасштабного движения переходит в энергию мелкомасштабных флуктуаций, роль которых играют изменения торсионных углов, а весь процесс сворачивания-разворачивания математически эквивалентен осциллятору с трением.
5. Показана важная роль α -спиралей в процессе самоорганизации белков.
6. Дано аналитическое описание механизма клеточного деления.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНО В
РАБОТАХ:

1. Попов Б.В., Попов Н.Б., Френкель З.М. Получение гена ретинобластомы с мутацией в С-домене и оценка рост-супрессирующей активности его продукта // Молекулярная биология. 1997. № 31 (2). С. 324-31.
2. Попов Б. В., Кулакова И. А., Попов Н. Б., Бондарь Т. О., Френкель З. М., Николаев А. В. Изучение роста мышинных фибробластов линии 10T1/2 с конститутивной экспрессией продукта экзогенного гена ретинобластомы человека // Цитология. 1998. № 40 (2/3). С. 152-160.
3. Попов Б. В., Кулакова И. А., Попов Н. Б., Френкель З. М. Характер фосфорилирования продукта гена ретинобластомы в стабильных клеточных линиях мышинового и человеческого происхождения // Онтогенез. 1998. № 29 (4). С. 245-253.
4. Попов Н. Б., Френкель З. М., Бондарь Т. О., Попов Б. В. Использование системы «глутатионтрансфераза-глутатион» для получения и очистки рекомбинантных белков, включающих продукты гена ретинобластомы // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3: Биология. 1998. № 4 (24). С. 92-104.
5. Бондарь Т. О., Френкель З. М., Попов Н. Б., Попов Б. В. Экспериментальная модель с использованием маркерных ферментов для оценки регуляции клеточного цикла и дифференцировки продуктом гена ретинобластомы. Сессия посвящённая 100-летию энзимологии. СПбГУ 7-8 апреля 1998 года. Тезисы опубликованы в Вестнике Санкт-Петербургского университета. Серия 3: Биология. 1998. № 4 (24). С. 112-114.
6. Френкель З. М., Мелькер А. И. Моделирование регуляции клеточного цикла. Неделя науки в СПбГТУ, декабрь 1998 года. Тезисы опубликованы в Вестнике СПбГТУ. 1998. С. 17-18.
7. Frenkel Z. M., Melker A. I. Growth activation: cell cycle engine as a nonlinear oscillator. NDTCS-99. Proceedings of SPAS, St. Petersburg, Russia. 13-18 June 1999. Vol. 3. P. C20-C22.

8. Frenkel Z. M., Melker A. I. The system of self activating gene as a nonlinear oscillator // Proceedings of SPIE. 2000. Vol. 4064. P. 171-179.
9. Melker A. I., Frenkel Z. M. Computer simulation of polypeptides structure self-organization. NDTCS-2000 // Proceedings of SPAS, St. Petersburg, Russia. 12-17 June 2000. Vol. 4. P. C30-C35.
10. Melker A. I., Frenkel, Z. M. Folding of polypeptides. Abstracts of Polymerwerkstoffe 2000 // Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 25-27 September 2000. P. 467.
11. Frenkel Z. M., Melker A. I. Role of helices in protein self-organization. NDTCS-2001 // Proceedings of SPAS, St. Petersburg, Russia. 12-17 June 2001. Vol. 5. P. C36-C40.
12. Frenkel Z. M., Melker A. I. Types of polypeptide self-organization. Molecular dynamics simulations // Proceedings of SPIE. 2001. Vol. 4348. P. 195-206.
13. Mendeleev S. A., Frenkel Z. M., Melker A. I. Self-organization of polynucleotides: a molecular dynamics study. NDTCS-2002 // Proceedings of SPAS, St. Petersburg, Russia. 10-16 June 2002. Vol. 6. P. C5-C10.
14. Frenkel Z. M., Melker A. I. Molecular dynamics of protein folding. NDTCS-2002 // Proceedings of SPAS, St. Petersburg, Russia. 10-16 June 2002. Vol. 6. P. C11-C23.
15. Frenkel Z. M., Melker A. I. Self-organization of protein with helical domains // Proceedings of SPIE. 2002. Vol. 4627. P. 154-159.
16. Frenkel, Z. M., Melker A. I. Self-organization of proteins: a molecular dynamics study of myoglobine. Abstracts of Polymerwerkstoffe 2002 // Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 25-27 September 2002. P. 129-130.