

Физические модели динамической подвижности белков



По своим динамическим свойствам белок отличается от поведения твердых тел и жидкостей. Это обстоятельство требует создания специальных физических моделей, на основе которых можно было бы установить количественные связи между изменениями макроскопических параметров белка и характеристиками его внутримолекулярной подвижности. Для этого необходимо познакомиться с основными физическими идеями и подходами, лежащими в основе современных представлений о динамической подвижности белка.

§ 1. Модель ограниченной диффузии (броуновский осциллятор с сильным затуханием)

Конформационная подвижность белка. Это явление определяется микродвижениями фрагментов белка с амплитудами больше или порядка 0,1 нм, что характеризует переходы между отдельными конформационными подсостояниями. Движение каждого отдельного фрагмента носит ограниченный характер, на который, кроме того, влияет и состояние ближайшего окружения. Так как длина свободного пробега частицы в плотной среде

$$l \simeq \sqrt{mk_B T / \gamma} \ll 0,1 \text{ нм}$$

(γ — коэффициент трения (XI.1.6), m — масса частицы ~ 100 а. е. м.) много меньше амплитуды конформационных движений, то характер движения фрагмента цепи носит диффузионный, или стохастический, характер. Смещение на величины 0,1 нм в конденсированной среде белковой макромолекулы заведомо сопровождается сдвигом отдельных молекулярных групп, окружающих фрагмент. Это требует преодоления потенциальных барьеров, что и соответствует переходам между отдельными конформационными подсостояниями. Вместе с тем физический механизм такого движения, согласно кинетической теории жидкостей Френкеля, эквивалентен движению в вязкой среде или в случае спонтанных движений — диффузии.

Движение фрагмента белка описывается двумя параметрами: конформационным потенциалом $U(x)$ и коэффициентом конформационной диффузии $D(x)$, — зависящими от конформационной координаты x . Зависимость коэффициента диффузии $D(x)$ от конформационной координаты x отражает микрогетерогенный характер белковой среды, что непосредственно связано с неоднородностью потенциальных барьеров. Таким образом, конформационное движение характеризуется двумя пространственными масштабами. С одной стороны, имеется «частокол» из потенциальных барьеров вследствие взаимодействия фрагмента цепи с плотной окружающей

средой, препятствующий свободным колебаниям фрагмента. С другой стороны, огибающая минимумов потенциальной «гребенки» представляет собой профиль значительно более плавно изменяющегося конформационного потенциала $U(x)$, движение вдоль которого связано с деформацией и изменением потенциальной энергии

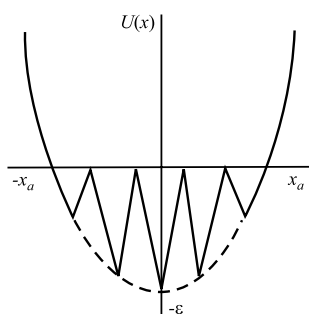


Рис. XI.1

Конформационные движения в вязкой среде (имитация вязкости потенциальной «гребенкой»):

x_a — средняя амплитуда конформационных флуктуаций, $U(x)$ — конформационный потенциал, ε — энергия активации конформационных движений

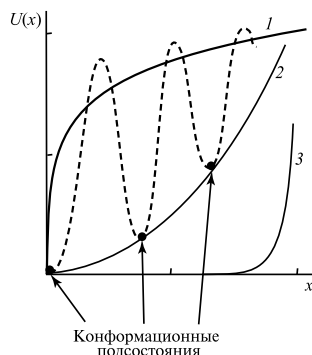


Рис. XI.2

Прыжковая диффузия по локальным конформационным подсостояниям в потенциале $U(x) = \alpha|x|^{1/\beta}$ при разных β (по Н. Frauenfelder, G. A. Petsko, D. Gsernoglou, 1979):

1 — $\beta \gg 1$; 2 — $\beta = 1/2$; 3 — $\beta \ll 1$

системы (рис. XI.1). Выход за пределы конформационной энергетической ямы, естественно, запрещен вследствие ограниченного характера диффузии фрагмента как составного элемента белковой структуры.

Релаксация фрагмента внутри профиля потенциала $U(x)$ напоминает аperiодическое движение маятника в очень вязкой среде. Примером может служить также распрямление сжатой пружины, погруженной в очень вязкую жидкость или смолу. Что касается конкретного вида кривой $U(x)$, то в гармоническом приближении он, как известно, задается квадратичной зависимостью энергии осциллятора от амплитуды колебаний

$$U = m\omega_0^2 x^2 / 2, \quad (\text{XI.1.1})$$

где ω_0 — частота колебаний. Как было показано (см. § 2 гл. IX), конформационные движения белковых цепей при $T = 200$ К обладают относительно низкими средними частотами $\omega \ll k_B T / \hbar \sim 3 \cdot 10^{13} \text{ с}^{-1}$. В более общем виде зависимость $U(x)$ можно представить как

$$U(x) \sim \alpha |x|^{1/\beta}, \quad (\text{XI.1.2})$$

где $\beta = 1/2$ для гармонического осциллятора.

На рис. XI.2 приведены различные кривые конформационного потенциала в зависимости от изменения параметра β , определяющего в данном случае крутизну и размеры потенциальной ямы, в пределах которой происходит диффузионный переход между отдельными конформационными подсостояниями. Мы ограничимся случаем гармонического потенциала, рассматривая, каким образом величина среднеквадратичного смещения (см. §1 гл. VII) фрагмента белка изменяется со временем в зависимости от температуры и характера микроокружения.

Формулировка модели. Рассмотрим модель (К. В. Шайтан, А. Б. Рубин, 1981), где анализируется поведение фрагмента белка в сильно структурированной среде, и сравним полученные теоретические выводы с экспериментальными данными.

Основная особенность проблемы состоит в том, что при тепловом равновесии со средой каждый фрагмент испытывает на себе случайные тепловые воздействия окружающей среды, т. е. ведет себя, с этой точки зрения, как броуновская частица. Согласно теореме о равномерном распределении энергии по степеням свободы в состоянии теплового равновесия, средняя поступательная энергия одномерного движения свободной частицы вдоль координаты x равна

$$\langle mv^2/2 \rangle = k_B T/2, \quad (\text{XI.1.3})$$

где знак $\langle \dots \rangle$ означает тепловое среднее по ансамблю ($v = dx/dt$ — x -компонента скорости частицы). Однако обсуждаемый фрагмент, находящийся в плотной среде, не является свободным: на него действуют силы, которые условно можно разделить на три типа. \square

1. Сила упругости участка цепи, обусловленная прочными связями фрагмента с другими молекулярными группами и являющаяся причиной существования конформационного потенциала $U(x)$,

$$F_{\text{упр}} = -dU(x)/dx.$$

Наличие определенной упругости позволяет моделировать движение цепи гармоническим осциллятором, для которого $U(x)$ определяется (XI.1.1), и, следовательно,

$$F_{\text{упр}} = -m\omega_0^2 x, \quad (\text{XI.1.4})$$

где m — масса фрагмента (~ 100 а. е. м. = $1,66 \cdot 10^{-22}$ г); ω_0 — частота конформационных колебаний в отсутствие затухания ($\lesssim 10^{12}$ с $^{-1}$). Отсюда константа упругости $m\omega_0^2 \sim 10^2$ г/с 2 при $\omega_0 \sim 10^{12}$ с $^{-1}$.

2. Сила трения, направленная против скорости $v = dx/dt$ и пропорциональная ей,

$$F_{\text{тр}} = -\gamma(dx/dt), \quad (\text{XI.1.5})$$

где γ — коэффициент трения.

Описывая сопротивление (трение) среды при движении частицы в терминах микровязкости η , можно оценить коэффициент трения по известной формуле Стокса

$$\gamma = 6\pi b\eta, \quad (\text{XI.1.6})$$

где b ($\sim 0,1 \div 1$ нм) — характерный линейный размер движущегося участка цепи (ср. (VII.1.11)). При $b \sim 0,1$ нм и минимально возможной вязкости $\eta \sim 10^{-3}$ Па · с (равно вязкости воды) коэффициент трения $\gamma \sim 10^{15}$ а. е. м./с.

3. Сила, обусловленная случайными толчками со стороны молекул среды вследствие теплового движения и равная

$$F_{\text{ст}}(t) = \sum_i F_{\text{ст}}(t_i), \quad (\text{XI.1.7})$$

где t_i — случайные моменты времени. Амплитуда силы также случайная величина.

В результате получим уравнение движения фрагмента в плотной среде (уравнение Ланжевена), которое имеет вид

$$\frac{d^2 x}{dt^2} + \gamma \frac{dx}{dt} + \frac{\partial U}{\partial x} = F_{\text{ст}}(t). \quad (\text{XI.1.8})$$

Это и есть модель динамики движения участка цепи в плотной среде под действием тепловых толчков микроокружения. Изменение во времени отклонения координаты $x(t)$ от среднего значения носит случайный характер и описывается уравнением (XI.1.8). Это уравнение — стохастическое уравнение, поэтому решить его означает найти функции распределения x и \dot{x} по заданным функциям распределения $F_{\text{ст}}(t)$. Решение такого рода уравнений проводят методом корреляционных функций. \square

Функция корреляции. Введем функцию $\varphi(\tau)$ для случайных отклонений $x(t)$, которая получается путем: 1) умножения случайного значения в начальный момент t , т. е. $x(t)$, на величину $x(t+\tau)$, которую принимает переменная x через дополнительный промежуток времени τ ; 2) последующего вычисления таких произведений для множества значений t и 3) их усреднения по всем t :

$$\varphi(\tau) = \langle x(t)x(t+\tau) \rangle. \quad (\text{XI.1.9})$$

Для стационарного случайного процесса функция корреляции $\varphi(\tau)$ не зависит от начального момента t . Очевидно, чем больше промежуток времени τ , тем с большим основанием можно считать, что $x(t)$ и $x(t+\tau)$ — статистически независимые случайные величины. В этом случае при $\tau \rightarrow \infty$

$$\varphi(\tau) = \langle x(t)x(t+\tau) \rangle = \langle x(t) \rangle \langle x(t+\tau) \rangle = 0, \quad (\text{XI.1.10})$$

где учтено, что среднее значение $\langle x(t) \rangle = 0$.

Таким образом, $\varphi(\tau)$ определяет степень статистической независимости случайных величин $x(t)$ и $x(t+\tau)$. При $\tau = 0$ корреляционная функция равна среднеквадратичному смещению частицы в начальный момент от среднего положения $\langle x(t) \rangle = 0$

$$\varphi(0) = \langle x(t)^2 \rangle, \quad (\text{XI.1.11})$$

которое всегда положительно независимо от знака отклонения. Так как величина $\varphi(\tau)$ не зависит от выбора момента измерения t , а зависит лишь от промежутка

времени τ , то, полагая начальный момент времени $t = 0$ и меняя обозначения $\tau = t$, можно записать

$$\langle x^2(t + \tau) \rangle = \langle x^2(t) \rangle \quad \text{или} \quad \langle x^2(0) \rangle = \langle x^2(t) \rangle.$$

В силу этого

$$\varphi(t) = \langle x(0)x(t) \rangle. \quad (\text{XI.1.12})$$

При больших значениях t справедливо асимптотическое выражение

$$\varphi(t) = \langle x(t)x(0) \rangle \sim \langle x^2(0) \rangle \exp(-t/\tau_c), \quad (\text{XI.1.13})$$

где τ_c — время корреляции стохастического движения, определяющего скорость затухания случайного отклонения x от среднего значения.

Среднеквадратичное смещение. Зависимость от t для броуновского осциллятора среднего квадратичного смещения может быть представлена в виде

$$\langle [x(0) - x(t)]^2 \rangle = \langle [\Delta x(t)]^2 \rangle = 2[\varphi(0) - \varphi(t)]. \quad (\text{XI.1.14})$$

Из (XI.1.14) следует, что если координату измеряли вначале в моменты времени, отличающиеся друг от друга на величину t , то среднее значение квадрата разности координаты равно удвоенной разности значений корреляционных функций в эти моменты времени.

Считая, что $F_{\text{ст}}(t)$ — случайная сила, действующая на осциллятор (XI.1.8) со стороны молекул окружающей среды, — является белым шумом, можно показать (К. Хир), что Фурье-образ корреляционной функции (XI.1.13) имеет вид

$$\varphi(\omega) = 2 \int_0^\infty \varphi(t) \cos \omega t \, dt = \frac{2k_B T \gamma}{m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2}. \quad (\text{XI.1.15})$$

Обращая Фурье-преобразование (XI.1.15), получим формулы для корреляционной функции $\varphi(t)$ в виде $\varphi(t) = [k_B T / (m\omega_0^2)] \exp(-t/\tau_c)$, где $k_B T / (m\omega_0^2) = \langle x^2(0) \rangle$.

1. Для слабозатухающих колебаний в твердом теле при $\omega_0 \gg \gamma/(2m)$

$$\varphi(t) = \frac{k_B T}{m\omega_0^2} \exp(-t/\tau_c) \cos \omega_0 t, \quad \tau_c = 2m/\gamma, \quad (\text{XI.1.16})$$

2. Для ограниченной диффузии при $\omega_0 \ll \gamma/(2m)$

$$\varphi(t) = \frac{k_B T}{m\omega_0^2} \exp(-t/\tau_c), \quad \tau_c = \gamma/(m\omega_0^2). \quad (\text{XI.1.17})$$

В обоих случаях величина $k_B T / (m\omega_0^2)$ — средний квадрат амплитуды тепловых флуктуаций положения частицы с энергией $k_B T$:

$$\langle x_a^2 \rangle = k_B T / (m\omega_0^2), \quad (\text{XI.1.18})$$

что легко найти из (XI.1.1), используя теорему о равномерном распределении энергии по степеням свободы (XI.1.3).

Значение функции корреляции в (XI.1.16) и (XI.1.17) при $t = 0$ также равно среднему квадрату амплитуды флуктуации положения частицы:

$$\varphi(0) = k_B T / (m\omega_0^2). \quad (\text{XI.1.19})$$

Подставляя (XI.1.15), (XI.1.16) и (XI.1.17) в (XI.1.14), найдем, что для ограниченной диффузии

$$\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle = \langle x_a^2 \rangle (1 - \exp(-t/\tau_c)), \quad \tau_c = \gamma / (m\omega_0^2), \quad (\text{XI.1.20})$$

а для колебаний в твердом теле

$$\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle = \langle x_a^2 \rangle (1 - \exp(-t/\tau_c) \cos \omega_0 t), \quad \tau_c = 2m/\gamma. \quad (\text{XI.1.21})$$

Выражения (XI.1.20) и (XI.1.21) совпадают с приведенными ранее (X.2.32) и (X.2.27). Выражения (XI.1.16) и (XI.1.17) описывают разные типы движения. В случае малых атомных колебаний в твердых телах (XI.1.16) среднее время корреляции $\tau_c = 2m/\gamma$ соответствует времени τ_c затухания амплитуды колебательного движения, происходящего с частотой ω_0 . При росте γ время τ_c уменьшается, что равносильно уменьшению времени, за которое успевает произойти заметное изменение амплитуды колебаний вследствие диссипации энергии.

При малых τ_c корреляция между отдельными значениями $x(t)$ и $x(t + \tau)$ быстро теряется. Последовательные значения $x(t)$ и $x(t + \tau)$ будут уже в этом случае независимыми, а значит, функция корреляции обращается в нуль, что следует из (XI.1.16) при $\tau_c \rightarrow 0$.

Выражение (XI.1.17) описывает другой тип движения, а именно ограниченную диффузию в гармоническом потенциале. Оно справедливо при очень больших коэффициентах трения. Время корреляции здесь пропорционально коэффициенту трения $\tau_c = \gamma / (m\omega_0^2)$. Это обусловлено уменьшением скорости диффузии, вызываемой увеличением сил сопротивления или вязкости среды; при этом делокализация частиц в процессе диффузии замедляется.

Изменение спектра γ -квантов. Движение фрагментов, определяемое формулами (XI.1.16) и (XI.1.17), вызывает изменение формы спектров γ -квантов, излучаемых или поглощаемых ядром в экспериментах по эффекту Мёссбауэра. Известно, что распространение плоской волны (γ -излучения) с затуханием описывается уравнением, в котором амплитуда колебания $A(t)$ пропорциональна:

$$A(t) \sim \exp \left[i\omega_e t - ikx(t) - \frac{1}{2}\Gamma t \right], \quad (\text{XI.1.22})$$

где ω_e — резонансная частота колебания; k — волновой вектор; Γ — ширина линии спектра излучения, связанная с естественным временем жизни τ^* возбужденного состояния центров излучения уравнением $\Gamma\tau^* = \hbar$ (X.2.20); $x(t)$ — координата, определяемая положением излучающего (поглощающего) центра. Так как координаты ядер меняются самопроизвольно вследствие тепловых флуктуаций, то это вызывает «сбой» фазы волны γ -излучения. В результате спектр γ -квантов становится зависимым от динамики ядра, характеризуемой среднеквадратичным смещением

ядер за время t и в гауссовском приближении имеем:

$$g(\omega) = \frac{\text{Re}}{\pi} \int_0^{\infty} \exp \left\{ -\frac{\Gamma}{2}t - i(\omega - \omega_e)t - \frac{1}{2\lambda^2} \langle [\Delta x(t)]^2 \rangle \right\} dt, \quad (\text{XI.1.23})$$

где $\Gamma \simeq 0,7 \cdot 10^7 \text{ с}^{-1}$ для ^{57}Fe ; ω_e — резонансная частота излучения без отдачи; ω — частота наблюдения; $\lambda = \lambda/(2\pi) = 0,013 \text{ нм}$; $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle$ — среднеквадратичное смещение ядра за время t .

В жидкостях вследствие неограниченной диффузии $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle \sim 2Dt$ (см. (X.2.27)), а в твердом теле и белке для $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle$ справедливы выражения соответственно (X.2.23), (XI.1.21) и (X.2.28), (XI.1.20). Спектральная функция (XI.1.23) нормирована следующим образом:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} g(\omega) d\omega = 1.$$

Вероятность поглощения или испускания γ -кванта без отдачи f' задается выражением

$$f' = \int g(\omega) d\omega; \quad |\omega - \omega_e| \sim \Gamma. \quad (\text{XI.1.24})$$

Подставляя выражения (XI.1.21) в (XI.1.23), найдем f' для твердых тел при естественном условии $\gamma/m \gg \Gamma$, но $\gamma/(2m) \ll \omega_0$ (т. е. малое затухание):

$$f'(T) = \exp(-a^2) \quad (\text{XI.1.25})$$

где $a^2 = \langle x_a^2 \rangle / \lambda^2$. Выражение (XI.1.25) называется фактором Дебая — Валлера (см. (X.2.26)).

Температурная зависимость $f'(T)$. Согласно (XI.1.25), $f'(T)$ определяется зависимостью $\langle x_a^2 \rangle$ от T и, как следует из соотношения (XI.1.18), должна носить плавный характер:

$$f'(T) = \exp[-k_B T / m\omega_0^2 \pi^2], \quad (\text{XI.1.26})$$

отражающий медленное уменьшение f' с увеличением температуры. Однако это не соответствует экспериментальным данным по зависимости $f'(T)$ для белков (см. рис. X.21).

Рассмотрим, чем определяется зависимость $f'(T)$ в случае ограниченной диффузии при сильном затухании $\gamma/(2m) \gg \omega_0$.

Подставляя (XI.1.20) в (XI.1.23), а затем в (XI.1.24), найдем, что

$$f'(T) = 1 - a^2 \exp(-a^2) \int_0^1 y^{n(T)} \exp(a^2 y) dy, \quad (\text{XI.1.27})$$

где $y = \exp(-t/\tau_c) = \exp(-m\omega_0^2 t / \gamma)$,

$$n(T) = \gamma(T) \Gamma / (2m\omega_0^2) = \tau_c / (2\tau^*).$$

Таким образом, видно, что температурная зависимость фактора $f'(T)$ тесно связана с величиной среднеквадратичного смещения ядра за время жизни $\tau^* \simeq 10^{-7}$ с. Изменение f' от температуры в этом случае определяется не плавной зависимостью (XI.1.18) $\langle x_a^2 \rangle$ от T , а сильной температурной зависимостью времени корреляции $\tau_c = \gamma/(m\omega_0^2)$ вследствие изменения γ с температурой. При этом изменяется отношение τ_c к времени жизни ядра τ^* , а от этого как раз зависит величина его смещения (относительно λ), регистрируемого за время жизни τ^* . В самом деле, при росте температуры основную роль играет не медленное увеличение параметра $a^2(T)$, а экспоненциальное уменьшение $\gamma(T)$, зависящее от микровязкости η :

$$\tau_c = \gamma/(m\omega_0^2) = 6\pi b\eta/(m\omega_0^2).$$

В случае $\tau_c \gg \tau^*$ вязкость среды столь велика, что ядро не успевает заметно сместиться и достичь границ потенциальной ямы за время $t = \tau^*$: $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle \sim \langle x_a^2 \rangle t/\tau_c \ll \lambda^2$ и фактор $f' \simeq 1$.

Повышение температуры уменьшает микровязкость

$$\eta(T) \sim \exp(\varepsilon/k_B T), \quad (\text{XI.1.28})$$

где ε — энергия активации микровязкости течения, а значит, с ростом температуры экспоненциально уменьшается время корреляции:

$$\tau_c \sim \eta \sim \exp(\varepsilon/k_B T), \quad (\text{XI.1.29})$$

Переходя к высоким температурам, где $\tau_c \ll \tau^*$, наблюдается обычная зависимость Дебая–Валлера (XI.1.26), когда за время τ^* величина $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle$ достигает предельного значения $\lambda^2 a^2$. В промежуточном случае $\tau_c \sim \tau^*$ происходит резкий переход от значений $f' \sim 1$ до $f' \sim \exp(-a^2)$. При $\tau_c \gg \tau^*$ спектр $g(\omega)$ состоит из узкой мессбауэровской линии. С ростом температуры происходит плавное уширение спектра до значений ширины $\sim (\Gamma + a^2/\tau_c)$. Затем, когда при дальнейшем увеличении температуры становится $\tau_c \lesssim \tau^*$, происходит быстрое уширение «крыльев» спектральной линии с резким уменьшением интенсивности в центральной части спектра и падением значений f' . При $\tau_c \ll \tau^*$ уширенная часть спектра воспринимается как гладкий фон, на котором резко выделяется узкая линия (рис. XI.3).

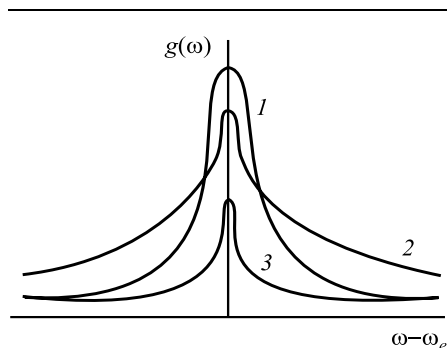


Рис. XI.3

Изменение формы мессбауэровского спектра $g(\omega)$ при изменении времени релаксации τ , с (увеличение температуры):

$$1 - \tau \gg 10^{-7}; 2 - \tau \simeq 10^{-7}; 3 - \tau \ll 10^{-7}$$

Таким образом, резкое уменьшение фактора f' в ограниченной области температур без уширения спектральной линии связано не с увеличением полной амплитуды движения x_a , а с уменьшением времени корреляции ниже критического значения $\tau_c \simeq 10^{-7}$ с. Полученные формулы применяют при анализе экспериментов по подвижности белков, выполненных методами γ -резонансной спектроскопии.

Формула (XI.1.27) для вероятности процессов без отдачи справедлива не только в случае модели броуновского осциллятора. \square

В частности, в рамках этой же теории можно рассмотреть и другую модель конформационных движений — движение в «вязком ящике» при наличии выделенного потенциального барьера. В этом случае, как показывают расчеты, величина энергии активации ϵ складывается из высоты барьера и энергии активации микровязкости. Обработка соответствующих экспериментальных данных для миоглобина и хроматофоров показала, что значение микровязкости в окружении мёсбауэровского атома при линейных размерах фрагмента $b \sim 0,5$ нм составляет ~ 10 Па·с при 300 К. Это намного превышает вязкость воды (10^{-3} Па·с), глицерина (~ 1 Па·с) и среднюю вязкость биологической мембраны (0,1–1 Па·с). Энергия активации вязкого течения ϵ , определенная по зависимости $f'(T)$, составляет 21 кДж/моль, амплитуда конформационного движения $x_a = 0,035$ нм (амплитуда валентных колебаний атома Fe намного меньше $x_0 \sim 0,001 \div 0,002$ нм). Подвижность атома Fe определяется целиком движением соответствующего фрагмента молекулы белка. Дегидратация белка и увеличение вследствие этого вязкости белка с падением содержания воды должно также приводить к росту фактора f' , что и наблюдается на опыте.

Для степеней свободы, где амплитуда движений не превышает 0,1 нм, существование выделенного барьера для конформационных флуктуаций наряду с потенциальной «гребенкой» маловероятно. Однако возможно наличие таких конформационных потенциалов в более сложных системах с выделенными локальными положениями равновесия.

В настоящее время существует ряд других формулировок модели, основанной на представлениях о движении фрагментов белка по типу броуновского осциллятора с сильным затуханием.

§ 2. Модель дискретных состояний и фазовых переходов

Рассмотрим другую модель подвижности белка, которая включает два выделенных конформационных состояния с узкими потенциальными «ямами», разделенными относительно широким ($\sim 0,05$ нм) барьером (Г. Фрауенфельдер). При низких температурах частица локализована в одной из «ям» и фактор $f' \simeq 1$. При повышении температуры частица за время τ^* успевает совершить перескоки между «ямами», что приводит к уменьшению вероятности f' и деформации спектра.

Как показывают расчеты (К. В. Шайтан) при условии, что длина прыжка $l \geq \lambda$, фактор f' должен составлять в среднем величину

$$\langle f' \rangle_{l \gg \lambda} = \left[\frac{1}{2} + \frac{\Gamma/2}{\Gamma + 4\nu} \right] \rightarrow \frac{1}{2} \quad (\nu \gg \Gamma), \quad (\text{XI.2.1})$$

где $\nu = (k_B T / h) \exp(-E/k_B T)$ — средняя частота перескока через барьер высотой E между «ямами». Однако реально фактор f' уменьшается примерно в 20 раз в узком температурном интервале. Расчеты показывают, что в рамках «прыжковой» модели в этом случае необходимо иметь не два, а около 20 конформационных подсостояний, между которыми и должны происходить перескоки. Так как полная амплитуда конформационных изменений за время τ^* не превышает $l < 0,1$ нм, то длина одного

прыжка $l \simeq 0,005$ нм, т. е. $l < \lambda$, и условие $l \gg \lambda$ не выполняется. Иными словами, модель двух дискретных подсостояний должна быть заменена континуальной моделью, где частая потенциальная «гребенка» соответствует наличию сил трения или эффективной микровязкости белкового окружения.

Для согласования с экспериментальными данными такая модель должна содержать две выделенные квазиравновесные конформации, каждая из которых содержит много микросостояний или конформационных подсостояний (см. § 8 гл. XIII).

Резкий характер температурного перехода $f'(T)$ позволяет также считать, что в этих условиях в белке происходит фазовый переход между подвижной и малоподвижной конформацией, сопровождающийся разрыхлением слабых связей (Д. С. Чернавский). Конформационный переход из закрытого в открытое состояние заключается в разрыве насыщенных слабых связей и освобождении выделенной степени свободы, после чего система приобретает подвижность и становится молекулярной «машинной» (см. § 1 гл. X). Считая, что размеры подвижных сегментов макромолекулы порядка $R \sim 2$ нм, энергии связей $E \sim 0,2 \div 0,5$ эВ, частоты колебаний в открытом состоянии $\omega_0 \sim 10^{12}$ с⁻¹, можно найти, что амплитуда колебаний подвижных сегментов, где локализован атом Fe, равна $\langle A \rangle \sim 0,05$ нм. Это намного больше длины волны резонансного γ -кванта (0,013 нм) и, следовательно, в открытом состоянии эффект Мёссбауэра отсутствует: $f' = 0$. В закрытом состоянии амплитуда колебаний сегмента существенно меньше и эффект Мёссбауэра уже определяется жесткостью связей атома Fe с непосредственным локальным окружением. Поэтому изменение фактора f' и подвижности с температурой можно интерпретировать как изменение доли макромолекул, находящихся в закрытом состоянии.

Вероятность застать молекулу в закрытом состоянии при температуре T равна

$$W_{\text{закр}} = [1 + \exp(\Delta F/k_B T)]^{-1}. \quad (\text{XI.2.2})$$

Здесь ΔF — разность свободных энергий двух состояний:

$$\Delta f = F_{\text{закр}} - F_{\text{откр}} = E_{\text{упр}} - n\bar{\epsilon} + nT(\bar{S}_{\text{закр}} - \bar{S}_{\text{откр}}), \quad (\text{XI.2.3})$$

где n — число связей; $\bar{\epsilon}$ и \bar{S} — средние значения энергии связи и энтропии в закрытом и открытом состоянии. В открытом состоянии энергия упругости $E_{\text{упр}}$ отсутствует и связи разорваны, а энтропия каждой группы, участвовавшей в образовании связи, увеличивается. Переход между состояниями происходит при температуре $T_{\text{кр}}$, соответствующей $\Delta F(T_{\text{кр}}) = 0$, которая равна $T_{\text{кр}} = (n\bar{\epsilon} - E_{\text{упр}})/(n\Delta\bar{S})$. В этой модели

$$f' = [1 - \exp(\Delta F/k_B T)]^{-1}. \quad (\text{XI.2.4})$$

Соответствие формулы (XI.2.4) экспериментальным данным наблюдается при $n\bar{\epsilon} - E_{\text{упр}} = 0,33$ эВ и $n\Delta\bar{S} = 20$ э. е.

Формула (XI.2.3) совпадает с выражениями, описывающими фазовые переходы первого рода в термодинамически неравновесных системах. Специфика сегментального перехода проявляется в том, что изменение энтропии происходит только в системе слабых связей, а изменение энергии — во всей системе.

Изменение энтропии должно зависеть от влажности, если в подвижном состоянии образуется полость, которая содержит несколько связанных молекул воды. В неподвижном состоянии полость закрывается и молекулы воды вытесняются в окружающее пространство. В модели ограниченной диффузии (см. §1 гл. XI) под ΔF и ΔS надо понимать свободную энергию и энтропию активации микровязкости. Большое изменение энтропии $\Delta S \simeq 20$ э.е. в фазовом переходе указывает на сложный характер молекулярной картины происходящих при этом процессов.

§ 3. Численное моделирование молекулярной динамики белков

Атомы, входящие в состав белковой молекулы, испытывают различные воздействия со стороны микроокружения и принимают участие в разнообразных видах движения. Крайне быстрые тепловые движения тесно связаны с редкими, в том числе функционально важными, перестройками. Внутренние движения глобулярных белков характеризуются изменениями амплитуды от 10^{-3} до 10 нм, энергии — от 0,4 до 420 кДж/моль, времен — от 10^{-15} до 10^3 с. Движение атомов и их групп в белке происходит как бы в клетке из окружающих атомов. На малых временах ($\sim 10^{-13}$ с) такие группы совершают колебательные движения относительно малой амплитуды ($\lesssim 0,02$ нм). На больших временах происходят коллективные смещения окружающих атомов, имеющие локальный, либо захватывающий всю молекулу характер.

☐ Нативный белок при комнатной температуре обладает целым набором возможных конформаций. Большинство из них находится вблизи средней конформации, которая может быть получена из рентгеноструктурных данных. Однако в каждый данный момент положение ряда атомов значительно отличается от средних положений. Такие флуктуации относительно усредненной структуры, вызванные тепловыми движениями атомов, играют важную роль в функционировании белка. Возникает вопрос: каков вклад движений отдельных атомов и особенно флуктуаций около их равновесных положений в конформационные переходы в белках? ☐

В гл. VIII, IX было показано, что конформационная энергия белка определяется совокупными атом-атомными взаимодействиями и может быть аппроксимирована потенциальными функциями типа (IX.1.1). Получающиеся в результате учета этих взаимодействий энергетические карты дают усредненные координаты атомов в соответствии с условием минимума общего конформационного потенциала (см. рис. IX.10). Таким путем, однако, невозможно непосредственно проследить за движениями и флуктуациями положения отдельных атомов. Другой подход основан на решении классических уравнений движения для отдельных атомов, в которых движущие силы определены из известных потенциальных функций атом-атомных взаимодействий.

Метод динамического моделирования. С помощью этого метода удастся получить подробную информацию о процессах в диапазоне от 10^{-3} пс до 10^3 пс (1 пс = 10^{-12} с) и вовлекающих несколько десятков или сотен атомов.

☐ В качестве модели молекулярной системы, содержащей N атомов, берут совокупность N взаимодействующих материальных точек, движение которых

описывается классическими уравнениями Ньютона:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} = \mathbf{F}_i \quad (i = 1, \dots, N). \quad \square \quad (\text{XI.3.1})$$

Материальные точки «моделируют» атомы, m_i — их массы, \mathbf{F}_i — действующие на них силы. Координаты и скорости всех частиц в исходный момент времени определяют ее поведение в последующие моменты времени. Современные ЭВМ позволяют проводить численное интегрирование таких уравнений для нескольких сотен или тысяч атомов на временах до $\sim 10^{-9}$ с. Получающиеся траектории движения всех атомов дают совокупную картину развития структурных флуктуаций во времени. В рассматриваемой механической системе в процессе ее движения сохраняется полная энергия. Температура определяется по теореме о равном распределении кинетической энергии по степеням свободы:

$$\frac{3}{2} k_B T = \left\langle \frac{m_i v_i^2}{2} \right\rangle, \quad (\text{XI.3.2})$$

где среднее берется как по всем частицам, так и по времени.

Как было показано (см. гл. VIII и IX), конформационная энергия белковой молекулы определяется совокупными атом-атомными взаимодействиями и может быть аппроксимирована потенциальной функцией:

$$U(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n) = \frac{1}{2} \sum k_b (b - b_0)^2 + \frac{1}{2} \sum k_\Theta (\Theta - \Theta_0)^2 + \frac{1}{2} \sum k_\varphi [1 + \cos(n\varphi - \delta)] + \\ + \sum \left(\frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} + \frac{q_1 q_2}{Dr} \right) + \sum \left(\frac{A'}{r^{12}} - \frac{C'}{r^{10}} \right). \quad (\text{XI.3.3})$$

В приведенном выражении для потенциальной энергии суммирование проводится по всем валентным связям, валентным углам, двугранным (торсионным) углам, валентно не связанным парам частиц и парам частиц, образующим водородную связь, соответственно. Константы в формулах зависят от типа связи и сортов частиц: b — длина валентной связи; Θ — величина валентного угла; φ — двугранный угол; r — расстояние между частицами. Сила, действующая на i -ю частицу, легко вычисляется из выражения для потенциальной энергии:

$$F_i = - \frac{\partial U(r_1, \dots, r_N)}{\partial r_i}. \quad (\text{XI.3.4})$$

Как видно, потенциал (XI.3.3) содержит члены, отвечающие различным физическим компонентам взаимодействия атомов: энергия деформации валентных связей, энергии деформации валентных и двугранных углов, энергии невалентных (ван-дер-ваальсовых и электростатических) взаимодействий. Значения потенциальных параметров атом-атомных взаимодействий являются эмпирическими, т. е. определяются из условия максимального соответствия рассчитанных по потенциалу и экспериментально измеренных спектральных, термодинамических и структурных характеристик низкомолекулярных компонент биологических макромолекул.

☐ В настоящее время на практике в компьютерном моделировании динамики биомacroмолекул используется несколько основных эмпирических потенциалов,

разработанных в разных исследовательских группах и отличающихся некоторыми деталями функциональной формы, атомного представления и эмпирических параметров. □

В атомном представлении эмпирического потенциала определяют классы атомов, учитывающиеся как отдельные силовые центры. В настоящее время используется два атомных представления биомакромолекул: представление «полярных протонов» и представление «всех атомов». В представлении полярных протонов в качестве отдельных силовых центров рассматриваются все неводородные («тяжелые») атомы и все полярные атомы водорода, способные образовывать водородную связь. В представлении всех «атомов» в качестве отдельных силовых центров рассматриваются все атомы биомолекулярной системы.

▽ В некоторых случаях в выражениях для потенциалов в качестве дополнительных силовых центров учитываются уединенные электронные пары атомов серы, введенные для корректного воспроизведения геометрии водородных связей. Дальнейшее усовершенствование вида потенциалов должно привести к введению силовых центров, отвечающих основным областям локализации электронной плотности (уединенные пары кислорода, взаимодействия между химическими связями). □

Представление «всех атомов», естественно, дает более реалистичные результаты, но требует значительно больших расходов машинного времени. В наиболее корректных работах, как правило, проводятся расчеты и приводятся результаты на основе обоих атомных представлений.

Однако, в используемых в настоящее время потенциалах имеется ряд серьезных недостатков, связанных с игнорированием поляризационных электростатических эффектов, неаддитивных взаимодействий, дальних электростатических взаимодействий, а также с изотропным приближением для невалентных взаимодействий.

▽ Поиски адекватных форм потенциала с учетом всех его основных компонентов проводятся путем сопоставления данных по МД при разных выражениях силового поля с экспериментальными результатами, полученными другими методами (ЯМР). Так, проводимое моделирование поведения тетрапептидов (*тир-триок-глиц-про*, *тир-триок-ала-про*, *фен-триок-гли-про*) в воде отражает конформационные особенности этих полимеров. Оказалось, что метод МД отражает конформационные особенности, установленные методом ЯМР, при правильном подборе параметров силового поля и при учете в явном виде роли водородных атомов в ароматических кольцах в электростатических взаимодействиях. Необходимо также модифицировать модель молекулы воды, которая обычно является трехцентровой структурой с несколькими валентными связями и «мягкими» валентными углами. □

В других работах делается попытка моделирования комплекса белок-металл. Поскольку в обычных моделях поляризуемость не включается в выражении для силового поля, метод МД не позволяет правильно учесть взаимодействие металлов и их лигандов в металл-содержащих белках. Получающиеся таким путем результаты дают нестабильный белковый комплекс, что не соответствует действительности. Модификация параметров взаимодействия металл-лиганд с учетом характера молекулярных орбиталей позволила получить и описать поведение стабильного комплекса Са-фосфолипаза на временах не меньше 100 пс.

В методе молекулярной динамики (МД) существуют два основных способа расчетов при $T = \text{const}$. В первом способе для обеспечения экспоненциальной релаксации величины кинетической энергии системы к требуемому значению периодически перенормируются скорости атомов. Характерное время релаксации является параметром метода и обычно выбирается из интервала 0,01–0,1 пс. При втором способе система испытывает воздействия случайных ударов, изменяющих величину и направление скорости отдельных атомов, что приводит к изменению полной кинетической энергии системы.

Основные результаты молекулярной динамики глобулярных белков получены в ранних работах. Они позволили выявить широкий спектр тепловых движений структуры белка, установить иерархию по характерным временам и масштабам, предложить физические модели для феноменологической интерпретации результатов.

▽ Первые вычислительные эксперименты для белковой молекулы — ингибитора трипсина (ИТ) панкреатической железы — были проведены по описанной выше процедуре в 1977 г. Дж. А. Мак-Кэмоном с сотрудниками. Эта молекула состояла из 58 аминокислотных остатков и содержала 454 тяжелых атома. Помимо них при динамическом моделировании в структуру включились еще четыре внутренние молекулы воды, локализованные согласно кристаллографическим данным. Интегрирование уравнений движения проводили с шагом по времени около 10^{-15} с. Удалось воспроизвести основной элемент вторичной структуры этого белка — антипараллельную скрученную β -структуру, существует также короткий α -спиральный сегмент. □

В последние годы выполнен целый ряд расчетов МД белков, связывающих низкомолекулярные лиганды. Это расчеты миоглобина, лизоцима, калбиндина, ретиналь-связывающего белка и некоторые другие. Как правило, в таких работах анализируется характер структурных изменений белка без лиганда. В этих работах получены интересные результаты, ряд наблюдавшихся структурных переходов может быть связан с функционированием белка (см. § 4 гл. XI).

В ряде работ моделировалась МД переноса электрона в белковых комплексах: феррацитохром С–феррацитохром В5 и феррацитохром С–феррацитохром С + пероксидаза в водном окружении. Это рекордные по затратам машинных ресурсов вычисления. Пространственная структура комплексов не была известна из эксперимента и была предсказана в результате модельных вычислений. В расчетах наблюдалась значительная конформационная лабильность области белок-белкового контакта. Оказалось, что по современным квантово-химическим представлениям ряд полученных промежуточных структур предпочтительнее для переноса электрона, чем исходная структура. Значительный интерес вызывает и перемещение поверхностей ароматической группы белка в область контакта за времена 100 пс. В то же время остаются до конца нерешенными проблемы корректности и биологической интерпретации численных экспериментов, в которых существенные структурные переходы наблюдаются на коротких временах (десятки пикосекунд).

Число работ по применению метода молекулярной динамики к олигопептидам невелико. В основном они посвящены оценке энтропийного вклада в барьеры конформационных переходов. На основе полученных данных делаются заключения о

предпочтительности тех или иных конформаций в растворе. Отмечается также высокая конформационная лабильность олигопептидов, что может, однако, быть результатом неравновесного начального распределения скоростей. Эта область применения метода МД дает важные результаты при установлении реальной структуры пептидных рецепторов.

Корреляционные функции в методе динамического моделирования. Временной характер корреляций координат и скоростей атомов можно исследовать методом динамического моделирования, где используются корреляционные функции. Фурье-преобразование корреляционных функций дает частотный спектр флуктуаций, что позволяет выделить частоты, дающие основной вклад во временной характер затухания флуктуаций.

Напомним, что мы использовали ранее корреляционные функции в модели броуновского осциллятора для описания динамики конформационных степеней свободы (XI.1.9) – (XI.1.15).

Рассмотрим физическую величину x , характеризующую положение атомной группы (координата, угол вращения). При движении значение этой величины испытывает определенные изменения. Обозначим $x(t)$ значение x в момент времени t . Между значениями $x(t)$ в разные моменты времени существует некоторая взаимозависимость или корреляция. То есть значение величины x в некоторый момент времени t влияет на вероятность различных ее значений в другой момент времени $t' = t + \tau$. Такая связь может быть охарактеризована временной корреляционной функцией в виде среднего от произведения

$$\langle x(t)x(t + \tau) \rangle.$$

Усреднение понимается здесь в статистическом смысле, те как усреднение по вероятностям всех значений, которые может иметь величина x в момент времени t . Для эргодических систем такое усреднение эквивалентно усреднению по времени t . Для стационарного процесса получающаяся таким образом величина зависит от разности τ :

$$\varphi(\tau) = \langle x(t)x(t + \tau) \rangle = \langle x(0)x(\tau) \rangle = \varphi(-\tau). \quad (\text{XI.3.5})$$

Такая функция носит название временной автокорреляционной функции, так как она построена с использованием значений одной и той же величины в различные моменты времени t . При неограниченном увеличении разности времен корреляция, очевидно, исчезает и, соответственно, функция $\varphi(\tau)$ стремится к нулю. \square

Для систем со многими степенями свободы x_1, x_2, \dots, x_n можно ввести также кросскорреляционные функции:

$$\varphi_{ik}(\tau) = \langle x_i(0)x_k(\tau) \rangle. \quad (\text{XI.3.6})$$

Вследствие симметрии уравнений механики по отношению к обращению времени безразлично, какую из величин x_i и x_k брать при усреднении в более ранний, а какую в более поздний момент времени:

$$\langle x_i(t)x_k(t + \tau) \rangle = \langle x_i(t + \tau)x_k(t) \rangle.$$

По графикам корреляционных функций можно судить и о поведении отдельных молекул групп. При этом для получения исходных данных применяют метод молекулярной динамики.

Корреляционные функции дают возможность количественного сравнительного изучения динамических свойств макромолекулярных систем. Для исследования таких функций применяются методы математического анализа и, в особенности, фурье-анализа, позволяющие найти частоты мод, дающих наибольший вклад в движение изучаемой молекулярной группы. Изучение кросскорреляционных функций позволяет судить о связи движений одних молекулярных групп с другими.

Таким образом, построение корреляционных функций по траекториям движения дает важную характеристику взаимозависимости смещений атомных групп в макромолекуле белка.

Молекулярная динамика ингибитора трипсина (ИТ). Полные результаты моделирования внутренней динамики ИТ приведены в работах М. Карплюса и Дж. А. Мак-Кэмона (1981). Исходные координаты всех тяжелых атомов получались из рентгеноструктурных данных путем минимизации потенциальной энергии конформационных взаимодействий. Скорости задавали равными по значениям, но случайными по направлениям. Кинетическая энергия соответствовала исходной температуре 300 К. Через несколько пикосекунд интегрирования уравнений движения проводится искусственная коррекция скоростей, поскольку наблюдается увеличение средней кинетической энергии (температуры) молекулы, вызванное наталкиванием атомов друг на друга в начальной конформации. Такую процедуру повторяли несколько раз. В результате через 35 пс система достаточно хорошо приближается к своему равновесному поведению. В конце подготовительного периода средняя кинетическая энергия отвечала температуре 306 К. Эта температура сохраняется в основной период моделирования, когда непосредственно вычисляются траектории движения атомов.

Основные результаты были получены для относительно короткого периода ~ 100 пс. Оказалось, что усредненная во времени структура несколько отличается от рентгеноструктурных данных: 0,21 нм для атомов α -углерода и 0,29 нм для всех остальных атомов. Наибольшие отклонения в положении основной цепи наблюдаются на обоих концах молекулы, а отклонения в положениях боковых цепей происходят в основном в случае заряженных групп, доступных действию растворителя. Это, видимо, связано с достаточно тонкими деталями описания взаимодействия внутрибелковых групп. Погруженное в центре молекулы белка ядро обладает плотностью (63 атома \cdot нм $^{-3}$), близкой к таковой по рентгеноструктурным данным (60 атомов \cdot нм $^{-3}$). Флуктуации положений атомов в белке по отношению к усредненной во времени структуре составляют для α -углеродных 0,06 нм и для всех остальных атомов 0,075 нм. Флуктуации на концах цепи существенно выше (до 0,12 нм). Флуктуации в значениях двугранных углов (см. § 3 гл. VIII) лежат в пределах $10-20^\circ$ для углов φ и ψ и $7-9^\circ$ для угла ω , причем в области β -структуры они больше, чем в α -спирали.

В молекуле ИТ обычно корреляционные функции смещения атомов характеризуются монотонным затуханием с временем затухания 1–2 пс. Быстрое затухание корреляционной функции ясно указывает на случайный диффузионный (броуновский) характер смещений атомов в пикосекундном временном интервале. Основной

вклад в эти смещения дают вращения атомных групп вокруг единичных связей (см. § 3 гл. VIII), поскольку колебания вдоль локальных валентных связей не влияют эффективно на величину общего смещения атомов, хотя могут накладываться на затухания корреляционной функции в виде высокочастотных компонентов.

Большой интерес представляют также обнаруженные флуктуации в значениях отдельных составляющих потенциальной энергии относительно величин, усредненных по 96 пс интервалу. Эти флуктуации составляющих общей энергии варьировали от 20 до 60 кДж/моль и сохранялись достаточно долго (2–15 пс). Однако значения общей потенциальной энергии давали меньшие флуктуации (4–16 кДж/моль в течение 2–5 пс) за счет взаимной компенсации одновременно возникающих отклонений в энергиях ван-дер-ваальсовых взаимодействий и внутреннего вращения вокруг единичных связей. Наряду с долгоживущими энергетическими флуктуациями в системе происходят также долгоживущие (до 20 пс) флуктуации в положениях α -углеродных атомов. Последние скорее всего связаны с переходами макромолекулы белка из одного конформационного подсостояния в другое на поверхности общей потенциальной энергии. В пользу этого свидетельствует корреляция между временами затухания таких энергетических флуктуаций и временами структурных переходов в белке между отдельными ротамерами в боковых цепях.

Детальное исследование динамики ароматических белковых цепей в молекуле ИТ показало решающую роль микроокружения в процессах релаксации возникающих флуктуационных изменений. Ароматическое кольцо *trp*-21 в белке ИТ находится в окружении других аминокислотных остатков, так что положение минимума потенциальной энергии на энергетической карте для него жестко определено по сравнению со свободным дипептидом, в котором ароматическое кольцо испытывает влияние только со стороны основной цепи (см. § 1, 2 гл. IX).

Уравнение движения кольца *trp*-21 является уравнением Ланжевена (XI.1.8) и имеет в данном случае вид

$$I \frac{d^2\Phi}{dt^2} + \gamma \frac{d\Phi}{dt} + \alpha\Phi = F_{\text{ст}}(t), \quad (\text{XI.3.7})$$

где $\Phi(t)$ описывает флуктуации угла вращения; $I = 7,5 \cdot 10^{15}$ г · см²/моль — момент инерции ароматического кольца относительно оси вращения; γ — коэффициент трения; α — константа жесткости; $F_{\text{ст}}(t)$ отражает случайные толчки, испытываемые кольцом во время флуктуаций микроокружения. На рис. XI.4 показаны флуктуации $\Delta\Phi$ угла вращения Φ *trp*-21, выраженные как отклонения от среднего значения $\langle\Phi\rangle$.

Из рисунка видно, что вращательное движение кольца *trp*-21 в белке носит менее регулярный характер по сравнению со свободным фрагментом вследствие столкновений с атомами микроокружения, которые тормозят движения кольца. Зависимость от времени нормированной корреляционной функции

$$\varphi(t) = \frac{\langle\Delta\Phi(t)\Delta\Phi(0)\rangle}{\langle[\Delta\Phi(0)]^2\rangle}$$

приведена на рис. XI.5. Как видно, кривая функции быстро затухает в белке по сравнению с изолированным *trp*-21. Среднее время между заметными изменениями

$F_{\text{ст}}(t)$ составляет $\sim 0,07$ пс. Как видно из рис. XI.4 (I), за этот короткий промежуток Φ не успевает заметно измениться $F_{\text{ст}}(t)$ — случайная величина с гауссовым распределением, и описываемые ею отдельные толчки влияют на движение кольца.

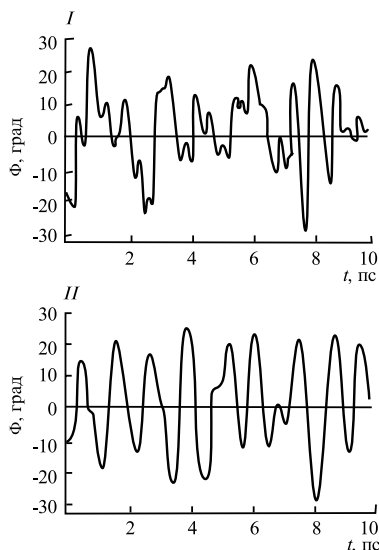


Рис. XI.4

Изменение угла вращения кольца *tyr*-21 (I) и изолированных тирозиновых фрагментов (II) при динамическом моделировании в белке за время 9,8 пс (по М. Karplus, В. R. Celin, J. A. McCammon, 1979)

$\Delta\Phi = \Phi - \langle\Phi\rangle$. Вращательное движение кольца *tyr*-21 в белке носит менее регулярный характер по сравнению со свободными фрагментами вследствие столкновений с атомами микроокружения.

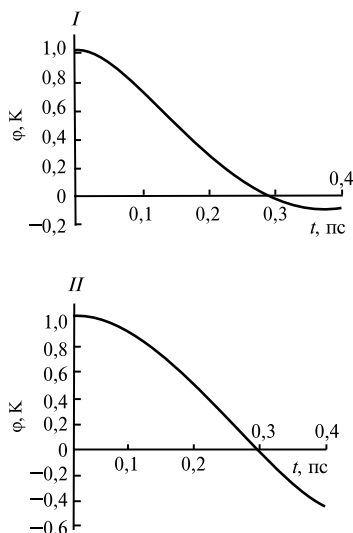


Рис. XI.5

Нормированная временная корреляционная функция отклонений тирозинового кольца в белке (I) и в изолированном тирозиновом фрагменте (II) (по М. Karplus, В. R. Celin, J. A. McCammon, 1979)

Значения коэффициентов в (XI.3.7) составляют, как показывает обработка экспериментальных данных, величины $\alpha = 5,5 \cdot 10^4$ Дж/(рад² · моль); $\gamma = 0,11$ г · см/(с · моль), а время затухания $\tau = \gamma/\alpha = 0,2$ пс.

На примере вращения ароматического кольца *tyr*-35, глубоко «погруженного» в молекулу белка, можно было исследовать молекулярные перестройки, требующие преодоления активационных энергетических барьеров.

На первом этапе моделирования конфигурации атомов в различных переходных состояниях, которые занимают места вблизи энергетического барьера, разделяющего на энергетических картах энергетические «овраги» начального и конечного состояний. Моделирование непосредственно процесса перехода осуществляется путем вычисления траекторий движения атомов через эти переходные состояния при заданных начальных скоростях их движения.

Оказалось, что кольцо *mir*-35 пересекает потенциальный барьер вращения за 0,5–1,0 пс. Эффекты трения замедляют переход, но не могут повернуть его в обратном направлении.

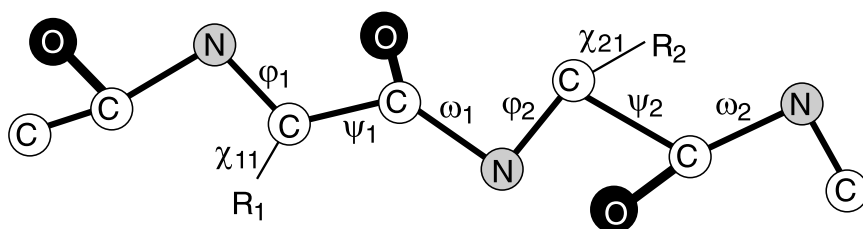


Рис. XI.6

Схема структуры дипептидов и названия торсионных углов, характеризующих их пространственную структуру

Динамика пептидов. Рассмотрим применение метода корреляционных функций к изучению динамики модифицированных дипептидов. Модификация состоит в том, что со стороны NH-группы присоединяется ацетильная группа ($\text{CH}_3\text{CO}-$), а со стороны COOH -группы присоединяется метиламин ($\text{CH}_3\text{NH}-$) (рис. XI.6).

Для характеристики конформации молекулы используются величины торсионных углов главной и боковых цепей.

Наиболее естественно анализ траекторий проводить с помощью нормированных автокорреляционных функций торсионного угла и нормированных кросскорреляционных функций двух разных торсионных углов специального вида (К. В. Шайтан). Нормированные автокорреляционные функции торсионного угла берутся в виде:

$$\varphi(\tau) = \langle \exp(i\alpha(t)) \exp(-i\alpha(t+\tau)) \rangle - |\langle \exp(i\alpha(t)) \rangle|^2, \quad (\text{XI.3.8})$$

где α — величина торсионного угла в моменты t и $t+\tau$.

Необходимая информация содержится в зависимости $\text{Re } \varphi(t)$, которая обычно и изучается. По этой функции и по ее спектру можно судить о характерных временах движения и типах динамического поведения торсионных углов.

Нормированные кросскорреляционные функции торсионных углов берутся в виде:

$$\begin{aligned} \varphi(t) = & \langle \exp\{i[\alpha(t) - \alpha(t+\tau)]\} \exp\{-i[\beta(t) - \beta(t+\tau)]\} \rangle - \\ & - \langle \exp\{i[\alpha(t) - \alpha(t+\tau)]\} \rangle \langle \exp\{-i[\beta(t) - \beta(t+\tau)]\} \rangle, \end{aligned} \quad (\text{XI.3.9})$$

где α и β — величины торсионных углов в моменты времени t и $t+\tau$. Наиболее часто изучается зависимость $\text{Re } \varphi(\tau)$. Заметим, что при любых α и β $\varphi(0) = 0$. Функция построена таким образом, что при согласованном движении углов α и β (положительной корреляции их динамики) значение $\text{Re } \varphi(\tau)$ возрастает.

Как следует из рис. XI.7, при согласованном изменении углов α и β их косинусы имеют одинаковый знак и складываются, что при усреднении дает возрастание значения функции при увеличении τ . При больших значениях τ функция, соответ-

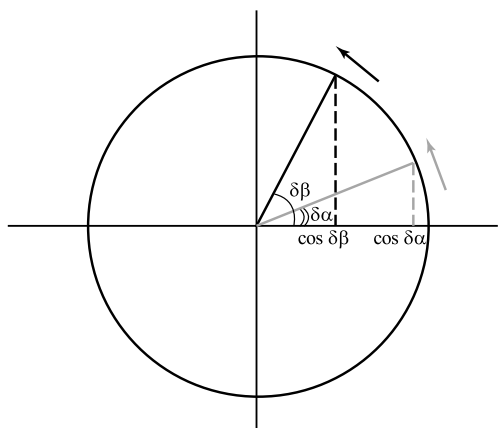


Рис. XI.7

К определению средних значений произведения $\cos \delta\alpha$ и $\cos \delta\beta$ при согласованном движении углов α и β (по Шайтану)

ственно будет стремиться к нулю, так как $\cos \delta\alpha$ ($\cos \delta\beta$) могут быть как положительными, так и отрицательными. Таким образом, по поведению кросскорреляционной функции можно судить о наличии или отсутствии корреляций при движении по торсионным углам. На рис. XI.8–12 приведены примеры авто- и кросскорреляционных функций, рассчитанных для торсионных углов некоторых модифицированных дипептидов. Соответствующие объяснения даны в подписях к рисункам.

Анализ траекторий с помощью карт свободной конформационной энергии молекул. В дополнение к анализу траекторий с помощью корреляционных функций покажем также результаты изучения карт свободной конформационной энергии макромолекул (К. В. Шайтан). По виду этих карт можно судить о связи энергетических характеристик молекулы с подвижностью отдельных ее групп. Карты свободной энергии строятся следующим образом. Рассчитываются методом молекулярной динамики поверхности распределения вероятности реализации различных конформаций энергии и их сечения. В логарифмическом масштабе эти проекции являются фактически картами свободной энергии молекулы, выраженной в единицах kT . На рис. XI.13–16 приведены карты уровней свободной энергии дипептидов для пар переменных, соответствующих рис. XI.9–12. Видно, что для коррелирующих степеней свободы наблюдается, как правило, протяженные узкие участки, вдоль которых происходит коллективная перестройка конформации дипептида.

Для некоррелирующих пар переменных имеется либо набор несвязанных острых локальных минимумов, переход между которыми требует преодоления высокого потенциального барьера, либо обширные области относительно свободного движения. Отметим здесь также, что строение гиперповерхностей уровней потенциальной энергии для систем с конформационными степенями свободы карди-

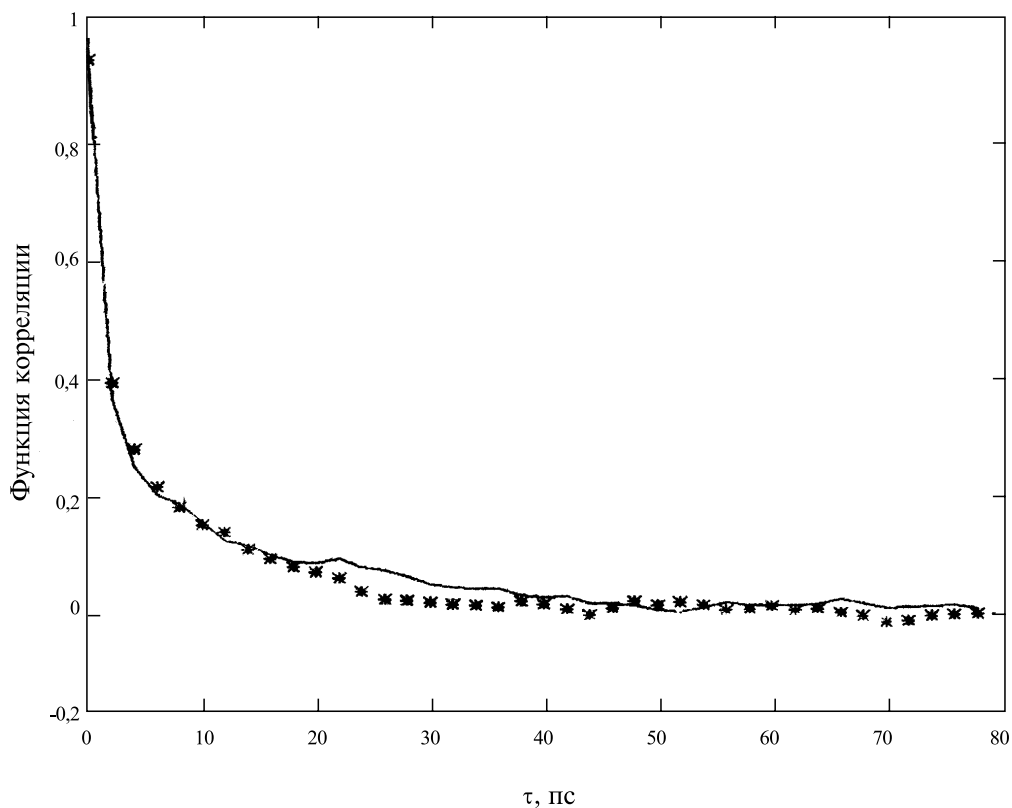


Рис. XI.8

Зависимости временных автокорреляционных функций (XI.3.8) углов φ (рис. XI.6) для модифицированных дипептидов *гли-асп* и *гли-асн* (по Шайтану)

Усреднение проведено по длине траектории 5000 пс, $T = 1000$ К. Средняя частота столкновений тяжелых атомов с молекулами среды 10 пс^{-1} . Молекулярная масса частиц среды 18. Характерное время затухания корреляций порядка нескольких пикосекунд

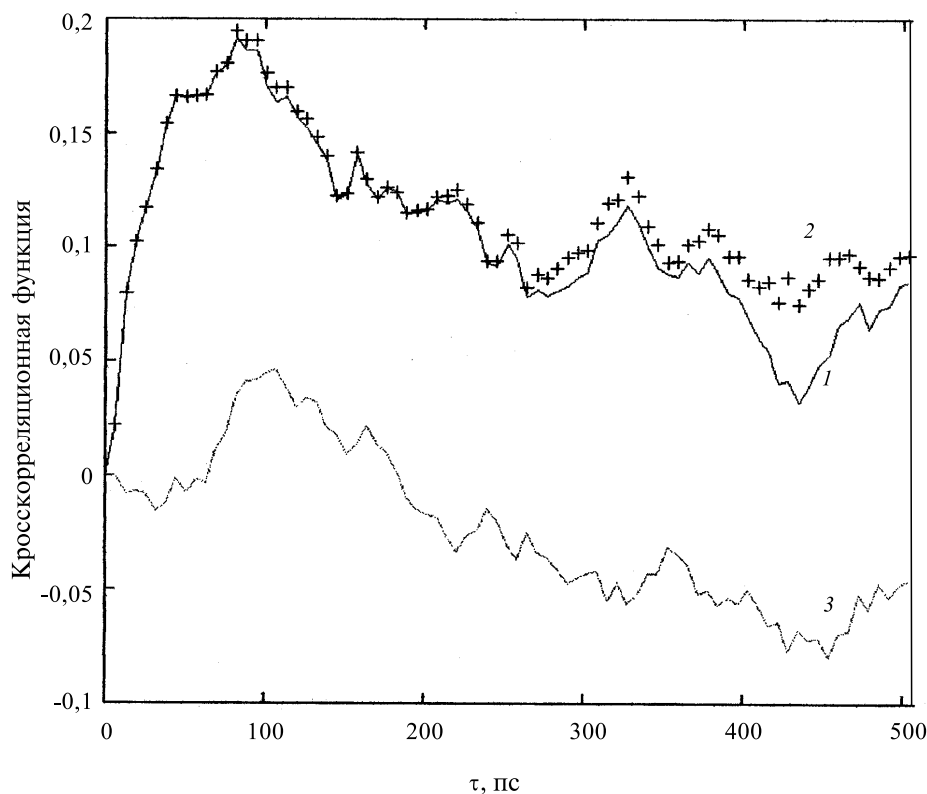


Рис. XI.9

Кросскорреляционная функция (XI.3.9) для углов ψ_1 и ψ_2 (рис. XI.6) тирозинового остатка модифицированного дипептида *тир-трп* (по Шайтану)

1 — вещественная часть; 2 — модуль; 3 — мнимая часть кросскорреляционной функции. Усреднение проведено по длине траектории 5000 пс, $T = 1000$ К. Средняя частота столкновений тяжелых атомов с молекулами среды 10 пс^{-1} . Молекулярная масса частиц среды 18. Наблюдается хорошая корреляция движений по данным степеням свободы на временном интервале порядка ста пикосекунд.

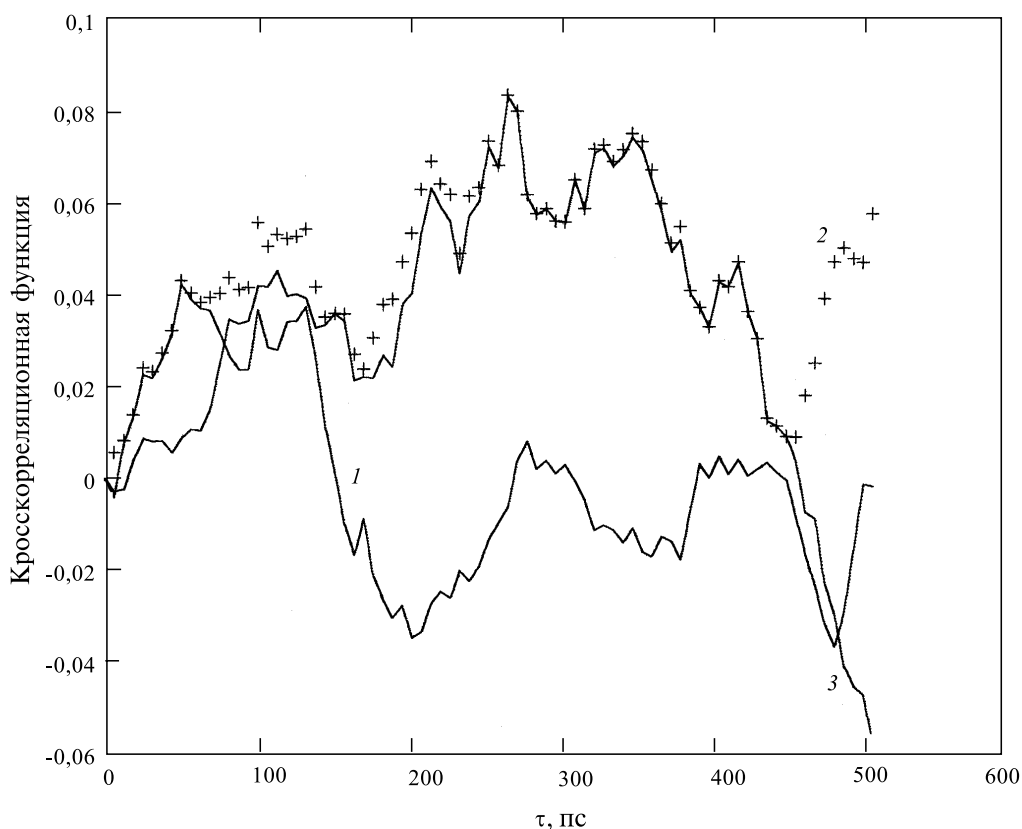


Рис. XI.10

Кросскорреляционная функция (XI.3.9) для углов ψ_1 тирозинового остатка и ψ_2 триптофанового остатка (обозначения торсионных углов на рис. XI.6) модифицированного дипептида *тир-трип* (по Шайтану)

1 — вещественная часть; 2 — модуль; 3 — мнимая часть кросскорреляционной функции. Усреднение проведено по длине траектории 5000 пс, $T = 1000$ К. Средняя частота столкновений тяжелых атомов с молекулами среды 10 пс^{-1} . Молекулярная масса частиц среды 18. Наблюдается умеренная корреляция движений по данным степеням свободы на временном интервале порядка нескольких сотен пикосекунд

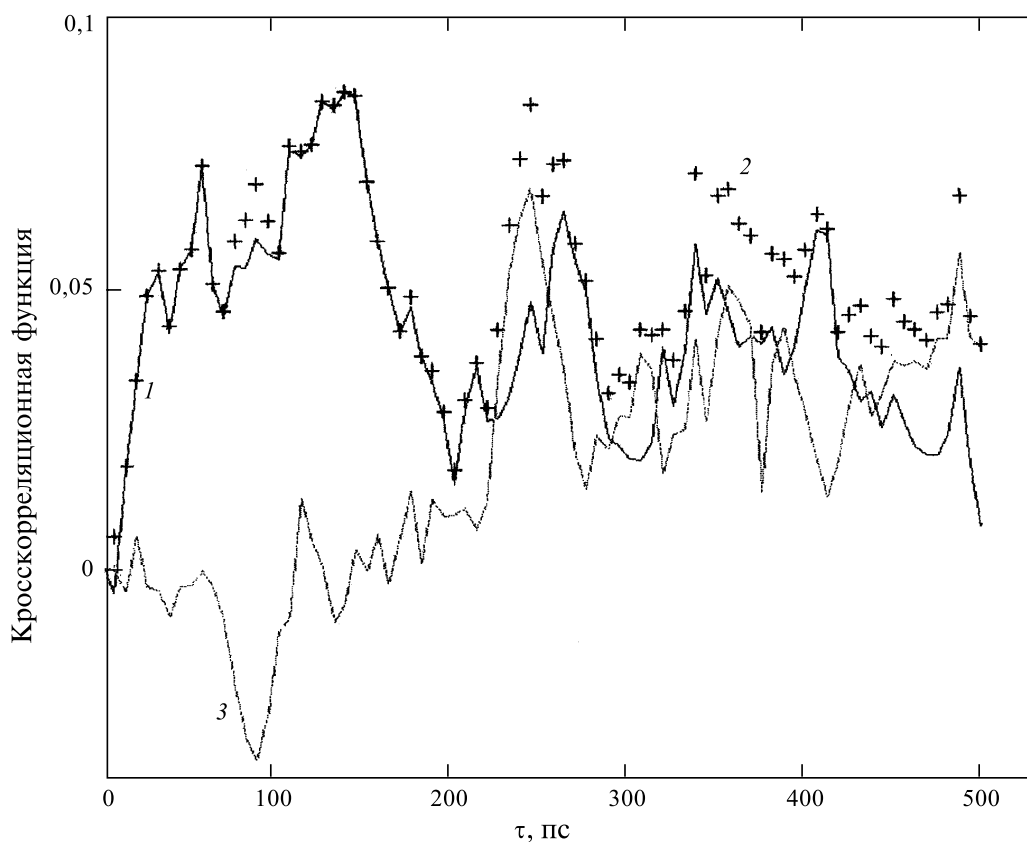


Рис. XI.11

Кросскорреляционная функция (XI.3.9) для углов ψ_1 и χ_1 тирозинового остатка модифицированного дипептида *mir-trp* (по Шайтану)

1 — вещественная часть; 2 — модуль; 3 — мнимая часть кросскорреляционной функции. Усреднение проведено по длине траектории 5000 пс, $T = 1000$ К. Средняя частота столкновений тяжелых атомов с молекулами среды 10 пс^{-1} . Молекулярная масса частиц среды 18. Наблюдается умеренная корреляция движений по данным степеням свободы на временном интервале порядка нескольких сотен пикосекунд

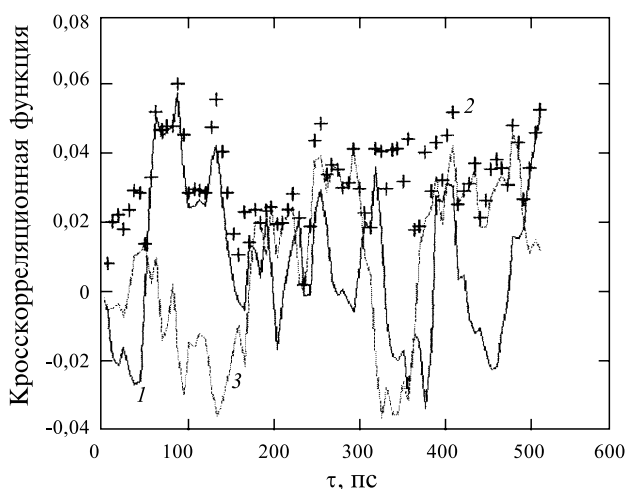


Рис. XI.12

Кросскорреляционная функция (XI.3.9) для углов ψ_1 тирозинового остатка и χ_1 триптофанового остатка (обозначения торсионных углов на рис. XI.6) модифицированного дипептида *тир-трп* (по Шайтану)

1 — вещественная часть; 2 — модуль; 3 — мнимая часть кросскорреляционной функции. Усреднение проведено по длине траектории 5000 пс, $T = 1000$ К. Средняя частота столкновений тяжелых атомов с молекулами среды 10 пс^{-1} . Молекулярная масса среды 18. Не наблюдается заметной корреляции движений по данным степеням свободы

нально отличается от аналогичных гиперповерхностей для жестких молекулярных систем, например, кристаллов.

Общий анализ топологии этих поверхностей был проведен на основе представлений теории Морса (К. В. Шайтан). Рис. XI.17 иллюстрирует особенности строения гиперповерхностей потенциальной энергии для конформационно-лабильных систем. Эти особенности, по-видимому, весьма важны для регуляции и организации функциональных процессов в биоструктурах.

Рассмотренные данные ясно показывают, что в пикосекундном временном интервале происходят локальные движения атомов на всех уровнях организации молекулы белка. В целом флуктуации положений атомов в молекуле белка являются неотъемлемой частью молекулярной динамики. Они характеризуются относительно большими временами ($\sim 10^{-11}$ с) и длятся достаточно долго, что несомненно имеет функциональное значение. Так, удалось показать, что в молекуле белка за счет корреляции флуктуаций отдельных атомов образуются сообщающиеся с внешней средой полости размером до $\sim 10^{-1}$ нм и с временем существования $\sim 10^{-7}$ с. Это создает условия для проникновения внутрь белковой глобулы отдельных молекул воды. Следовательно, в белке как конденсированной системе, не обладающей, однако, жесткостью и упругостью твердого тела, небольшие спонтанные изменения структуры происходят в результате локальных конформационных флуктуаций уже

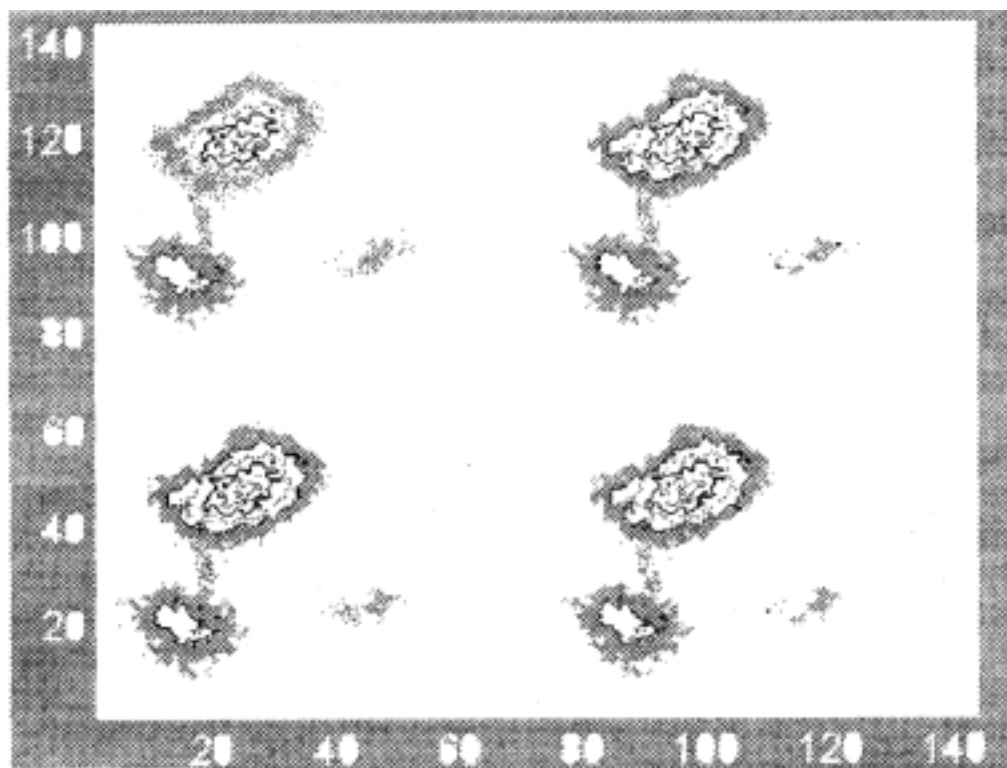


Рис. XI.13

Карта уровней вероятности (свободной энергии) модифицированного дипептида *тир-трп* в пространстве торсионных углов φ и ψ (ось y) тирозинового остатка (по Шайтану)

Области изменения углов от -360 до 360° в пропорциональном масштабе. Длина траектории 5000 пс, $T = 1000\text{K}$. Средняя частота столкновений тяжелых атомов с молекулами среды 10 пс^{-1} . Молекулярная масса частиц среды 18. Наблюдается узкий перешеек для перехода в конфигурационном пространстве между двумя локальными минимумами. Соответствующая кросскорреляционная функция представлена на рис. XI.9

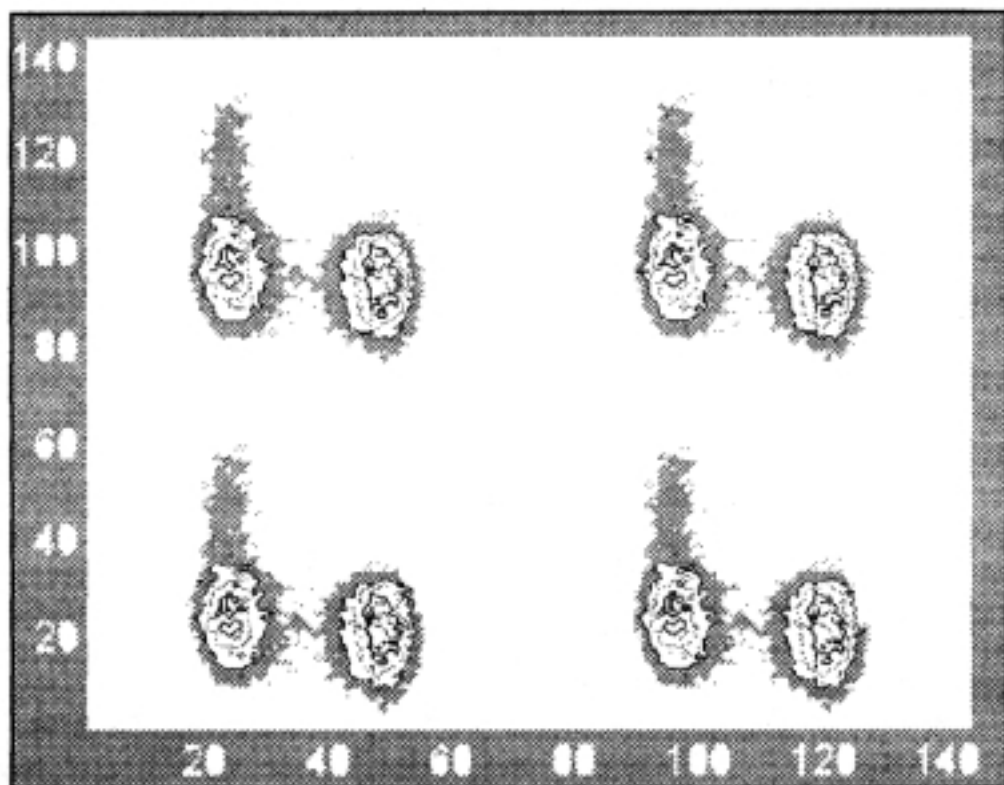


Рис. XI.14

Карта уровней вероятностей (свободной энергии) модифицированного дипептида *тир-трип* в пространстве торсионных углов ψ_1 тирозинового остатка и ψ_2 (ось y) триптофанового остатка (по Шайтану)

Области изменения углов от -360 до 360° в пропорциональном масштабе. Длина траектории 5000 пс, $T = 1000\text{K}$. Средняя частота столкновений тяжелых атомов с молекулами среды 10 пс^{-1} , молекулярная масса частиц среды 18. Наблюдается узкий перешеек для перехода в конфигурационном пространстве между двумя локальными минимумами и сильная анизотропия левого минимума. Соответствующая кросскорреляционная функция представлена на рис. XI.10

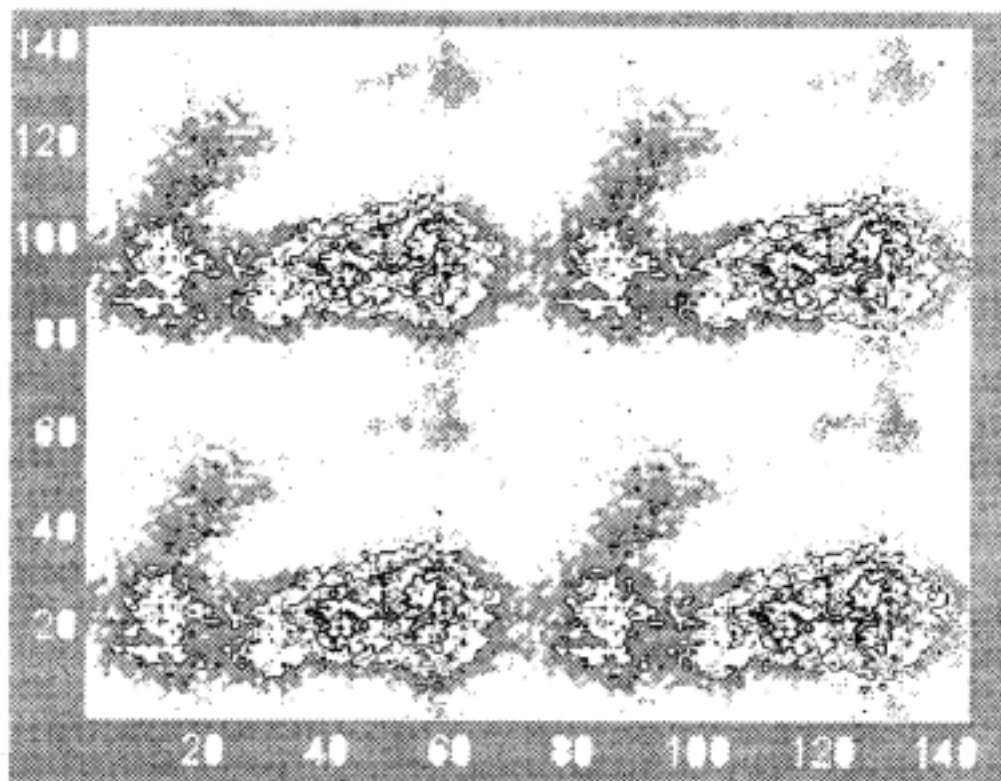


Рис. XI.15

Карта уровней вероятности (свободной энергии) модифицированного дипептида *тир-трп* в пространстве торсионных углов χ_1 и ψ_1 (ось y) тирозинового остатка (по Шайтану)

Области изменения углов от -360 до 360° в пропорциональном масштабе. Длина траектории 5000 пс, $T = 1000$ К. Средняя частота столкновений тяжелых атомов с молекулами среды 10 пс^{-1} . Молекулярная масса частиц среды 18. Наблюдается относительно свободное широкомасштабное и сильное анизотропное движение в конфигурационном пространстве этих углов. В области изгиба долины значительная корреляция при движениях по этим углам. Соответствующая кросскорреляционная функция представлена на рис. XI.11

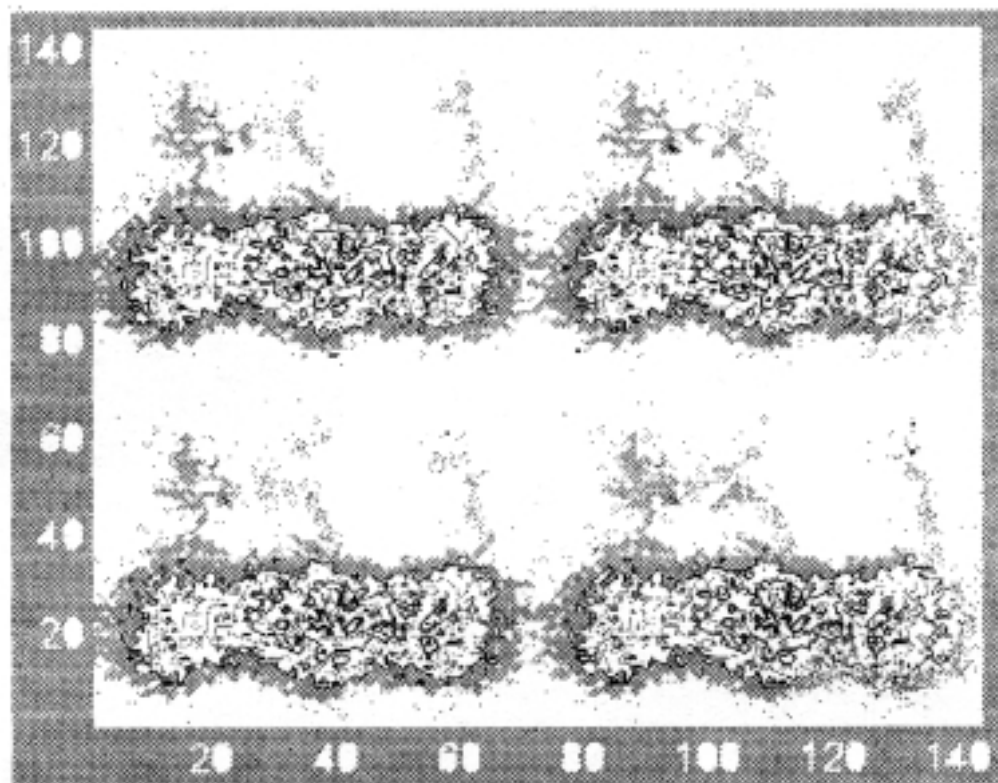


Рис. XI.16

Карта уровней вероятности (свободной энергии) модифицированного дипептида *тир-трип* в пространстве торсионных углов ϕ_1 тирозинового остатка и χ_1 (ось x) триптофанового остатка (по Шайтану)

Области изменения углов от -360° до 360° в пропорциональном масштабе. Длина траектории 5000 пс, $T = 1000$ К. Средняя частота столкновений тяжелых атомов с молекулами среды 10 пс^{-1} . Молекулярная масса частиц среды 18. Наблюдается относительно свободное широкомасштабное и сильно анизотропное движение в конфигурационном пространстве этих углов. Энергетическая долина не изогнута и корреляция при движениях по этим углам практически отсутствует. Соответствующая кросскорреляционная функция представлена на рис. XI.12

за несколько пикосекунд. Корреляция этих флуктуаций может привести к большим по масштабу структурным сдвигам и переходам между отдельными конформационными состояниями. Тепловые движения атомов оживляют усредненную рентгеноструктурную картину строения белка и лежат в основе физических причин

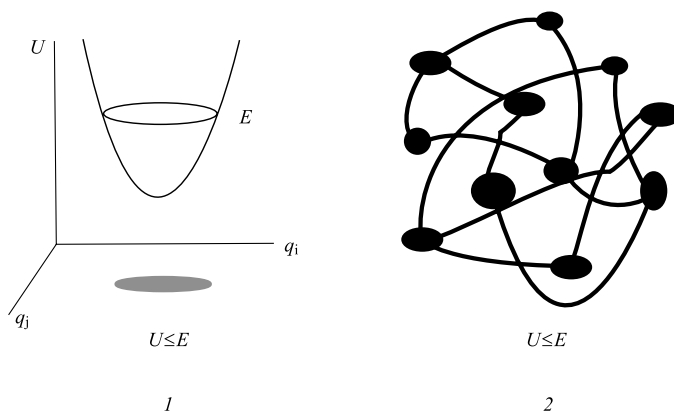


Рис. XI.17

Схематическое изображение строения гиперповерхностей уровней потенциальной энергии жестких (1) и конформационно лабильных (2) молекулярных систем (по Шайтану)

В случае жестких систем поверхность потенциальной энергии представляет собой многомерный параболоид, а гиперповерхность уровня топологически эквивалентна гиперсфере. Для конформационно лабильных систем, характеризующихся множеством локальных минимумов в конфигурационном пространстве топологическая структура гиперповерхности уровня энергии много сложнее и схематически может быть охарактеризована как множество локусов, соединенных между собой узкими «трубками»

спонтанных конформационных перестроек. Несомненна роль флуктуаций в электронно-конформационных взаимодействиях, сопровождающих процессы транспорта электронов, миграции и трансформации энергии, ферментативного катализа в биологических структурах. □

§ 4. Молекулярная динамика белка.

Мы рассмотрели основные экспериментальные и теоретические подходы к изучению и физическому моделированию внутримолекулярной динамики биополимеров и, в первую очередь, белка. Связывание низкомолекулярных лигандов с белком гема представляет собой простую реакцию, на примере которой удобно показать, как применяются выше изложенные представления.

Динамика миоглобина. Наиболее исследован процесс связывания монооксида углерода CO с атомом железа гемовой группы миоглобина. На рис. XI.18 показано сечение активного центра миоглобина Mb плоскостью, проведенной под прямым углом к плоскости гема. Гемовый карман образован в основном гидрофобными аминокислотами, и размер его составляет примерно 0,5 нм. Атом железа образует

ковалентные связи с атомами азота пиррольного кольца и азотом проксимального гистидина. Со стороны гемового кармана он граничит с дистальным гистидином. Азот $N^{\epsilon 2}$ дистального гистидина удален от гемового центра на 0,4 нм. Вход в гемовый карман блокируется пропионовой кислотой гема.

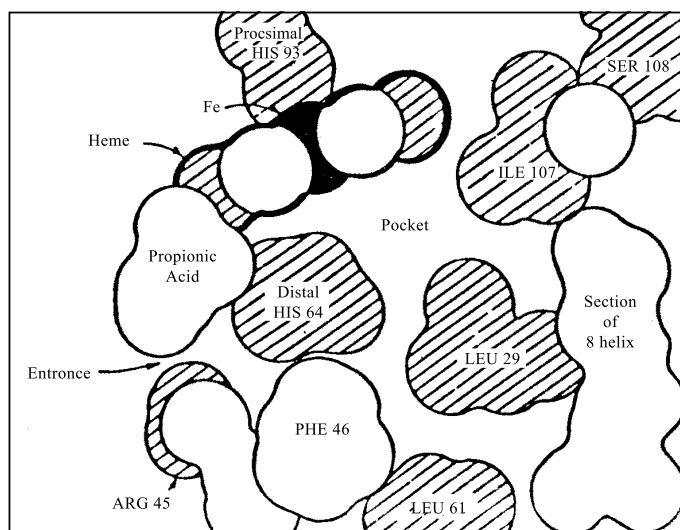


Рис. XI.18

Поперечное сечение через область вблизи активного центра миоглобина. Вход в карман гема расположен между *guc*-64 и пропионовой кислотой. Зачерненные группы находятся в плоскости, а незачерненные — над плоскостью, содержащей железо (по Kendrew et al., 1959)

В экспериментах изучалась кинетика обратимого связывания лиганда CO с гемовым железом и конформационные изменения белкового интерьера активного центра, участвующие в этом процессе. В исходном состоянии MbCO подвергается действию лазерной вспышки, которая разрывает связь между лигандом и гемовым железом. В результате фотодиссоциации миоглобин переходит в деоксиформу. Это приводит к уменьшению поглощения в полосе Сорэ (для MbCO при 423 нм) и к появлению полосы поглощения (полоса III) в спектре миоглобина около ~ 760 нм ($\sim 13\,000\text{ см}^{-1}$), характерной для его форм, лишенных лигандов.

Полоса III является следствием образования связи низкоспинового железа с порфирином в комплексе с переносом заряда, включающего орбитали железа и порфирина. Положение максимума зависит от расстояния между железом и плоскостью гема и увеличивается с расстоянием. Другой фактор, влияющий на положение максимума полосы III, связан с конформационным состоянием белка в области F-спирали, где локализован проксимальный *guc*-93 (рис. XI.18). Движение F-спирали отражается на положении полосы III, которая характеризует таким образом конформационные перестройки в белке.

После фотодиссоциации группа CO может опять связываться с атомом железа, что уменьшает поглощение при $13\,000\text{ см}^{-1}$. Поэтому кинетику связывания лигандов CO железом при разных температурах изучают по изменению во времени после действия вспышки поглощения в полосе Сорэ или при 760 нм. Форма спектральной

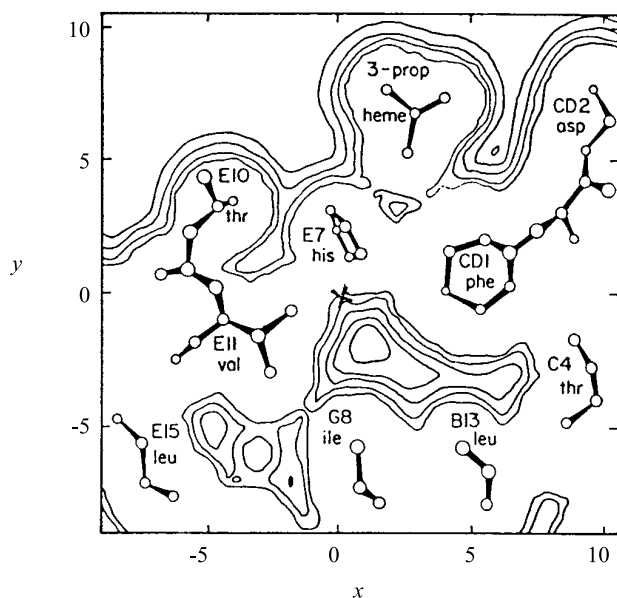


Рис. XI.19

Контурная карта взаимодействия «миоглобин–лиганд» в плоскости xy при $z = 3,2\text{ Å}$ (см. текст). Расстояния даны в Å и контур в ккал. Данные величины соответствуют 90, 45, 10, 0 и -3 ккал/моль относительно лиганда в бесконечности. Наивысший контур ближайший к атомам, проекция которых в плоскости рисунка обозначена кругами (по Brooks, Karplus, Pettitt, 1987).

полосы III и изменение положения ее максимума служит источником информации о конформационном состоянии белка гема.

На рис. XI.19 показана карта конформационной энергии Mb. В центре находится энергетический минимум, соответствующий гидрофобному карману, на краю которого локализован атом железа. Наиболее короткий путь лиганда из кармана на периферию молекулы гема проходит между *гис* E7 и *вал* E11.

Расчеты показывают, что в жесткой структуре белка энергетические барьеры, которые должен преодолеть лиганд после фотодиссоциации, превышает 400 кДж/моль, что делает нереальным его диффузию в молекуле белка при обычных температурах. Уже отсюда можно предположить, что перемещение лиганда в полости гема и выход наружу в окружающий белок раствор возможно лишь при внутримолекулярных смещениях белковых подгрупп. Иными словами, речь идет о внутримолекулярных перестройках белка, которые должны

носить функциональный характер, обеспечивающий диффузию лиганда в белковой глобуле.

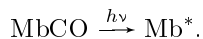
Рассмотрим теперь, какие экспериментальные данные подтверждают это предположение.

В работах Фрауанфельдера изучалась кинетика рекомбинации CO с Mb после действия лазерной вспышки при разных температурах. Кинетические кривые приведены на рис. XI.20. Доля молекул Mb, которые не рекомбинировали с CO при данной температуре, уменьшается со временем в диапазоне от 10^{-6} с до 1–10 с. При низких температурах (10 К–160 К) кинетика носит явно выраженный неэкспоненциальный характер (независимый от концентрации CO). При температурах выше 200 К форма кинетических кривых резко меняется. На кривых появляется новая медленная компонента, соответствующая экспоненциальному характеру реакции, скорость которой уже зависит от концентрации CO в окружающем белок растворе. Сложное кинетическое поведение процесса рекомбинации $\text{Mb} + \text{CO} \rightarrow \text{MbCO}$ не может быть описано в рамках простого уравнения реакции первого порядка, подчиняющейся закону Аррениуса:

$$K = K_0 \exp(-\Delta E/k_B T).$$

С формальной точки зрения процесс рекомбинации (рис. XI.20) включает несколько температурно зависимых стадий, каждая из которых имеет собственную энергию активации, что свидетельствует от структурных перестройках в белке.

Экспериментально конформационные изменения были обнаружены по сдвигу максимума поглощения и негомогенному уширению полосы III после фотодиссоциации MbCO. Такого рода неравномерное изменение спектра а процессе рекомбинации указывает на то, что связывание CO в белке после вспышке света приводит не только к уменьшению количества диссоциированных молекул Mb. Оно говорит и об участии разных конформационных состояний белка в этом процессе при разных температурах. При наличие лиганда в состоянии MbCO железо находится в плоскости гема в низкоспиновом состоянии. Непосредственно после действия вспышки происходит фотодиссоциация MbCO за 100 фемтосекунд ($1 \text{ фс} = 10^{-15} \text{ с}$), отрыв CO от железа, переход железа в высокоспиновое состояние и выход его из плоскости гема на расстояние r . В этом положении Mb находится в конформационно напряженном неотрелаксированном состоянии Mb*.



В силу этого и наблюдается красный сдвиг полосы III на 100–200 см^{-1} по отношению к положению 13 000 см^{-1} равновесной дезоксиформы Mb. Совокупность молекул Mb* характеризуется набором разных конформационных подсостояний с соответствующим набором расстояний x до плоскости гема. При низких температурах ($T < 50 \text{ К}$) лиганды CO, находящиеся вблизи Fe^{2+} разных r , могут рекомбинировать с Fe^{2+} , переводя железо в исходное низкоспиновое состояние. Рекомбинация происходит преимущественно с формами Mb, где железо находится на больших расстояниях r от плоскости гема, что приводит к необратимому изменению полосы III и уменьшению исходного поглощения.

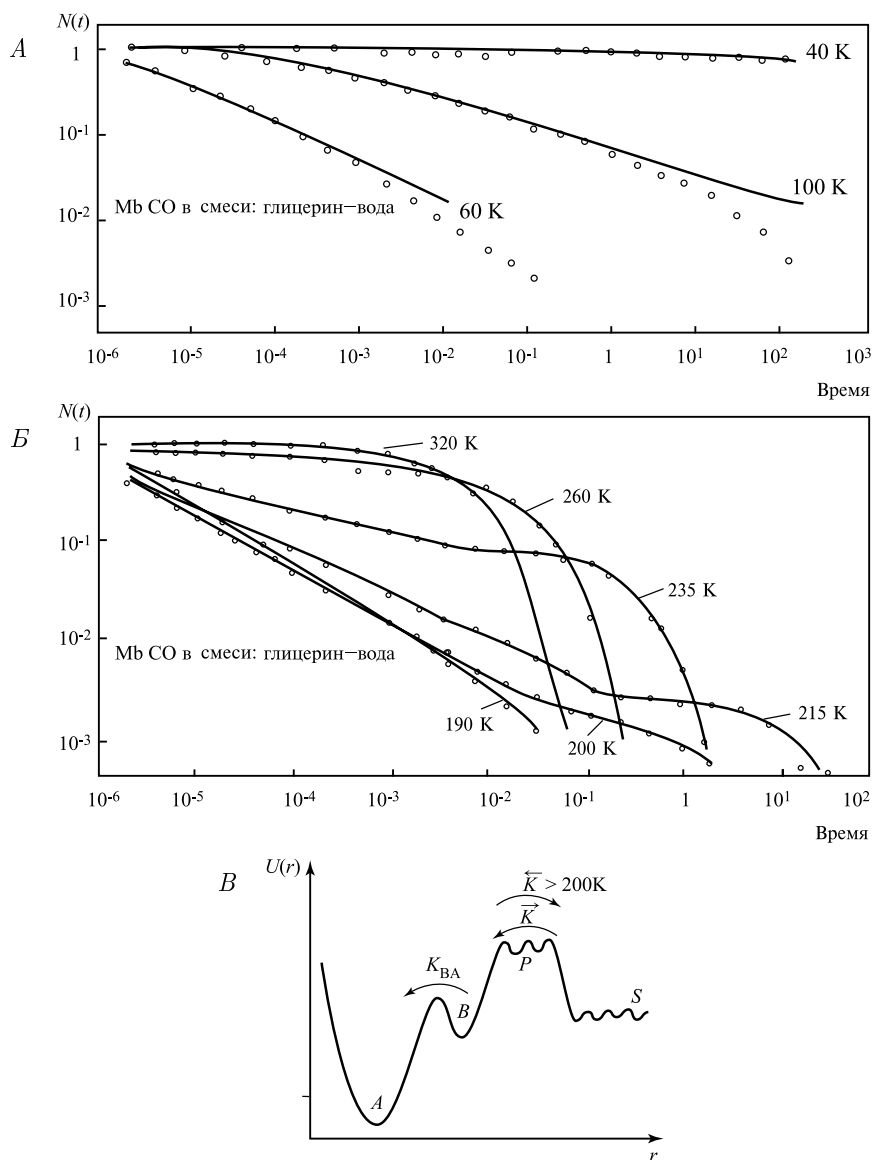


Рис. XI.20

Кинетика реакции связывания лигандов молекулами гем-содержащих белков (по Фраунфельдеру, 1990)

A — Рекомбинация CO и Mb после фотодиссоциации при $T < 160$ K. Кривые аппроксимируются выражением $N(t) = (1 + t/t_0)^{-n}$, где n и t_0 — параметры, определяемые для каждой температуры

B — Рекомбинация CO и Mb после фотодиссоциации при $T > 190$ K

B — Энергетический профиль процесса рекомбинации CO и Mb. A — состояние MbCO; B — CO в гидрофобном кармане гема; P — белковая матрица; S — растворитель; K_{BA} — константа рекомбинации; \bar{K} и \bar{K} — константы миграции лиганда по белковому матриксу

Наблюдаемая общая скорость рекомбинации $\text{CO} + \text{Mb}^* \rightarrow \text{MbCO}$ характеризуется набором констант скоростей, отвечающих распределению Mb^* по конформационным состояниям, т. е. по значениям x и соответствующим энергетическим барьерам активации.

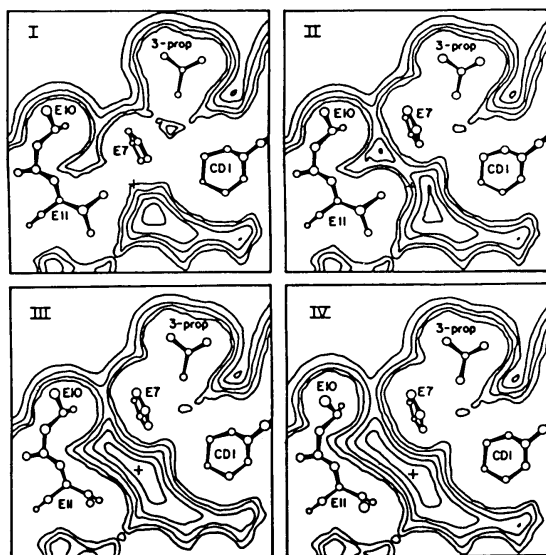


Рис. XI.21

Контурная карта взаимодействия миоглобин-лиганд в плоскости xy (по Brooks, Karplus, Pettitt, 1987)

Контурная карта взаимодействия миоглобин-лиганд. Расстояния даны в Å. Контурам соответствуют значения 90, 45, 10, 0, и -3 ккал/моль по отношению к энергии бесконечно удаленного лиганда. Самые высокие по энергии уровни являются ближайшими к атомам, чья проекция на плане рисунка отмечена кружочками. Части I–IV: вращения боковых цепей

При низких температурах ($T \sim 50$ К) структура белкового матрикса настолько жесткая, что атом железа Fe^{2+} после отщепления CO не может полностью отрелаксировать в Mb к своему новому равновесному положению. Таким образом, при низких температурах рекомбинация CO и Mb практически не затрагивает релаксационных процессов в белке. Положение принципиально меняется при $T > 180\text{--}200$ К, когда происходит размораживание конформационных степеней свободы белка (ср. рис. X.21). Крупномасштабные движения включают сдвиг высокоспинового атома Fe^{2+} до равновесного положения в полости гема дезоксиформы Mb . Происходит общая релаксация конформационно-направленного состояния белка Mb^* , к равновесному дезоксисостоянию, включающая активацию движений проксимального *гис-93* на F-спирали. Система характеризуется распределением активационных барьеров и констант скоростей, соответствующих разным подсостояниям, по которым флуктуирует молекула. Длина волны максимума полосы III вновь возрастает до 116 см^{-1}

при 300 К, что говорит об увеличении активационного барьера, а скорость рекомбинации замедляется при $T > 200$ К (рис. XI.20). Причина этого состоит в том, что при $T > 100$ К лиганд СО может выйти из гидрофобного кармана, удаляясь от Fe^{2+} в растворитель.

Проблема выхода лиганда СО из гидрофобного кармана к периферии белка решается методами численного моделирования внутримолекулярной динамики Mb (§ 3 гл. XI). Вычисления показали, что узкое место, определяющие высоту барьера для диффузии лиганда, находится в области боковых цепей *guc*-E7, *val*-E11 и *thr*-E10. Торсионные вращения этих трех боковых цепей на различные углы требуют энергетических затрат не более 8–10 ккал/моль. Однако энергетический барьер при этом снижается до 20 кДж/моль (Карплюс) по сравнению с 400 кДж/моль при жесткой структуре. Это соответствует размораживанию конформационной динамики белка. На рис. XI.21 приведена энергетическая карта, показывающая появление энергетических «долин» для диффузии лиганда в белке.

Таким образом обратная рекомбинация лиганда и молекул гемовых белков после фотодиссоциации определяется двумя энергетическими барьерами (рис. XI.20, б). Внутренний барьер — это барьер связывания с гемовым железом. Ниже температуры 160 К процесс рекомбинации описывается температурно-независимым распределением энергий активации по подсостояниям. Константа скорости не зависит от вязкости растворителя. Выше 160 К пик распределения энергий активации сдвигается на 10 кДж/моль в сторону более высоких значений. Это вызвано конформационной релаксацией белка в основном состоянии. При $T \sim 300$ К быстрые равновесные флуктуации приводят к усреднению констант скоростей рекомбинации. Выше 210 К лиганд покидает молекулу белка и выходит в растворитель, что обусловлено миграцией лиганда через флуктуирующий белковый матрикс. Константа скорости на этом этапе сильно зависит от вязкости растворителя. Таким образом, весь процесс рекомбинации включает переходы между конформационными подсостояниями различных уровней. Флуктуации между конформационными подсостояниями полностью расторможенного белкового матрикса позволяют лиганду проникать через него, а флуктуации другого типа ответственны за релаксацию констант и скорости внутривеликовской рекомбинации и железа гема.

§ 5. Общая характеристика молекулярной динамики биополимеров

В настоящее время отсутствует строгая физическая теория, связывающая структуру биополимера и его биохимическую активность. Для развития теоретических представлений о физических основах функционирования биологических систем необходимо изучение корреляции между функциональной активностью биополимеров и их внутренней конформационной подвижностью, т. е. относительными движениями групп с амплитудами, значительно превышающими амплитуды валентных колебаний. По-видимому, для большинства биохимических процессов конформационная подвижность является неотъемлемой составляющей.

∇ Биополимеры представляют с точки зрения физики чрезвычайно сложные объекты. Наличие линейной памяти, вторичной и третичной структуры, а также существенно нелинейный характер межчастичных взаимодействий приводят к

весьма разнообразным свойствам. □

Конформационная подвижность возникает при определенных условиях, связанных со структурой объекта, которые реализуются при достаточно высокой степени гидратации (сольватации). Для биополимеров существенна также высокая степень кооперативности, которая вносит определенную специфику в динамические свойства белков. Например, α - и β -спиральные участки обладают повышенной жесткостью и их можно рассматривать как элементы некоторой конструкции, формирующей каркас макромолекулы. Естественно, динамические свойства каркаса значительно отличаются от свойств более мягких и менее упорядоченных участков макромолекулы. С другой стороны, относительно жесткие элементы каркаса формируют коллективные конформационные степени свободы.

Мы видели, что подвижность по конформационным степеням свободы биополимеров носит стохастический характер и реализуется как ограниченная диффузия фрагментов и групп молекул. Однако механизмы диффузионных процессов в плотных структурированных средах устроены достаточно сложно, тесно связаны с корреляцией флуктуаций и требуют специального изучения.

▽ Как известно, малые колебания атомов в молекулах и кристаллах с амплитудой $x_a \sim 0,001 - 0,01$ нм достаточно хорошо могут быть описаны в рамках гармонического приближения. Соответствующие упругие постоянные для валентных колебаний лежат в диапазоне $K = 10^5 - 10^6$ дин/см, а характерные частоты $\omega \sim 10^{13}$ с⁻¹. Эффекты ангармонизма обуславливают межмодовое взаимодействие, приводящее к колебательной релаксации с характерными временами $\tau \sim 10^{-12}$ с. Однако гармоническое приближение совершенно не годится для описания конформационных движений в биомacroмолекулах с амплитудой $x_a > 0,01$ нм. Плотность белковой глобулы сравнима с плотностью жидкостей и органических кристаллов. Поэтому смещения здесь на величину, превышающую 0,01 нм, как и в случае жидкостей, требует образования флуктуационной плотности или «дырки», характеризуемой свободной энергией активации $\Delta G_0^\#$. Иными словами, конформационные движения в биополимерах ограничены по амплитуде, как и в твердых телах, но требуют энергии активации, как и в случае диффузии в жидкости (рис. XI.22). □

При рассмотрении наиболее часто встречающихся конформационных флуктуаций с полной амплитудой $x_a \gtrsim 1$ Å и в отсутствии резко выраженных локальных минимумов широко используется модель броуновского осциллятора как модель «вязкого ящика» (§1 гл. XI).

Элементы вторичной структуры оказывают значительное влияние на динамические свойства биомacroмолекул. Элементы образованного ими каркаса испытывают ограниченное броуновское движение с параметрами, определяемыми линейными размерами, жесткостью, микровязкостью и т. п. Движение простейших элементов — боковых групп и связанных молекул растворителя — может быть рассмотрено в рамках модели броуновского осциллятора. Напомним, что времена корреляции этих движений лежат в наносекундном диапазоне, а полные амплитуды $x_a \sim 0,03 - 1$ нм.

▽ Анализ соответствующих стохастических уравнений показывает, что основной вклад в флуктуации жестких элементов каркаса дает первая гармоника, которая практически определяет профиль и времена корреляции флуктуационного

изгиба. Так, для свободной α -спирали, моделируемой упругим стержнем (или трубкой) флуктуационный профиль определяется средним квадратичным смещением в каждой точке стержня. \square

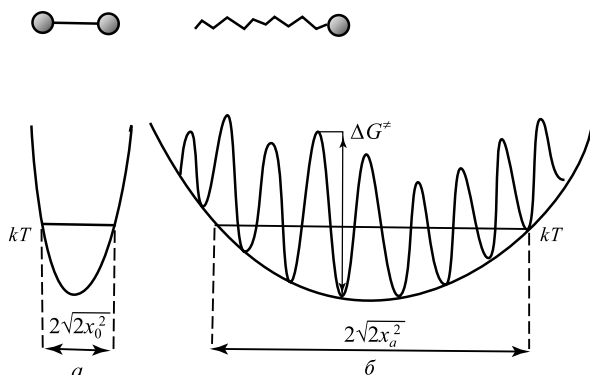


Рис. XI.22

Характерный квазиодномерный профиль потенциальной энергии *a* — для высокочастотных (валентных) колебаний, *б* — для конформационных движений

В локальных минимумах происходят высокочастотные колебания практически так же, как и в случае *a*. Флуктуации энергии приводят к миграции из одного локального минимума в другой и, в конечном счете, к ограниченной диффузии во всей классической доступной области. Локальные минимумы и высоты барьеров ΔG^\ddagger , вообще говоря, не фиксированы и флуктуируют за счет взаимодействий с другими степенями свободы

При реальных значениях параметров амплитуды флуктуаций свободных α -спиралей могут достигать нескольких ангстрем, а времена релаксации лежат в микросекундном диапазоне.

Задача о флуктуациях β -структур, моделируемых пластинами, решается путем добавления к уравнению изгибных колебаний пластины дополнительных членов, описывающих затухание и тепловой шум.

Оценки показывают, что β -структуры при прочих равных условиях должны быть менее жесткими по отношению к изгибам, чем α -спирали. При указанных выше значениях параметров для свободной β -структуры амплитуда флуктуаций составляет несколько ангстрем, а время корреляции при вязкости $\eta_p \sim 100$ пз лежит в микросекундном диапазоне.

Таким образом, в белке и в средах, имеющих относительно жесткий каркас, имеется набор связанных элементов, резко различающихся временами корреляции. Наиболее быстрые и мелкомасштабные (относительно временного положения равновесия) флуктуации свойственны боковым группам. Эти группы образуют жидкоподобную демпфирующую среду вокруг спиральных участков полипептидного каркаса. Резкое различие во временах релаксации боковых групп и α -, β -элементов упрощает описание флуктуационного поведения системы, позволяет воспользоваться гидродинамическим приближением и не учитывать корреляции между флуктуациями боковых групп и каркаса. Иными словами, существование данной иерархии времен

релаксации дает возможность при изучении флуктуационной динамики белковой глобулы моделировать ее жидкоподобной каплей, армированной упругим каркасом (рис. XI.23). Рассмотрение диффузионных процессов в структурированных средах белков, влияние вязкости растворителя на их конформационную динамику основано на динамической модели армированной капли.

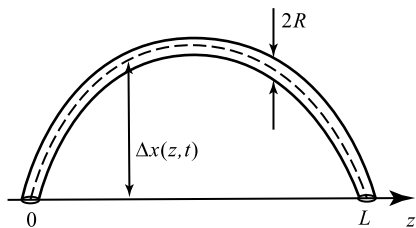


Рис. XI.23

Наиболее вероятный профиль изгибных флуктуаций жесткого элемента каркаса

Роль вязкости растворителя и корреляции флуктуаций и динамика белков. Выше мы широко пользовались понятием микровязкости белка как мерой диссипативных процессов при конформационных движениях. Хотя интуитивно использование микровязкости не вызывает затруднений, физический смысл этого понятия не так прост. Особенно актуальным этот вопрос становится при изучении влияния вязкости растворителя на скорости внутрибелковых процессов.

Рассмотрим эту проблему с точки зрения корреляции флуктуаций, с которой тесно связано понятие микровязкости белка и влияние на нее вязкости растворителя. Конформационные движения в конденсированной фазе (белка) могут происходить лишь при наличии в соответствующем месте флуктуационной полости или «дырки». Образование «дырки» внутри глобулы может происходить двумя способами. Во-первых, за счет собственного свободного объема глобулы и, во-вторых, за счет проникновения в глобулу через ее поверхность «дырок», образующихся в растворителе. Сжимаемость белка существенно ниже, чем жидкостей, и при не слишком больших значениях вязкости растворителя η_s , проникновение дырок внутрь глобулы определяет зависимость скорости внутрибелковых процессов от η_s . Чтобы понять природу этого вклада, можно выделить условно в системе белок – растворитель несколько слоев. Обозначим k_0^* и k_0 средние частоты образования и схлопывания «дырки» необходимого радиуса $R_0 \leq R_s$. Согласно принципу детального равновесия

$$k_0^*/k = \exp(-\Delta G_0^\# / kT) \sim \eta_s^{-\alpha},$$

где $\Delta G_0^\# = \alpha \Delta G_s^\#$ — энергия образования дырки требуемого радиуса R_0 , R_0 — радиус дырки, диффундирующей в первый слой глобулы, R_s — радиус дырок, определяющих самодиффузию молекул растворителя

$$\alpha = \begin{cases} (R_0/R_s)^2, & R_0 < R_s \\ 1, & R_0 \geq R_s. \end{cases}$$

Величина $k_0 \sim 10^{13} \text{ с}^{-1}$. Конформационные движения поверхностных групп в на-

ружном слое глобулы могут происходить лишь при наличии соответствующей «дырки» в растворителе (рис. XI.24).

Движение дырок характеризуется средними частотами конформационных переходов, приводящих к образованию и исчезновению «дырки» в наружном слое при наличии «дырки» в растворителе. Если последняя отсутствует, то можно считать

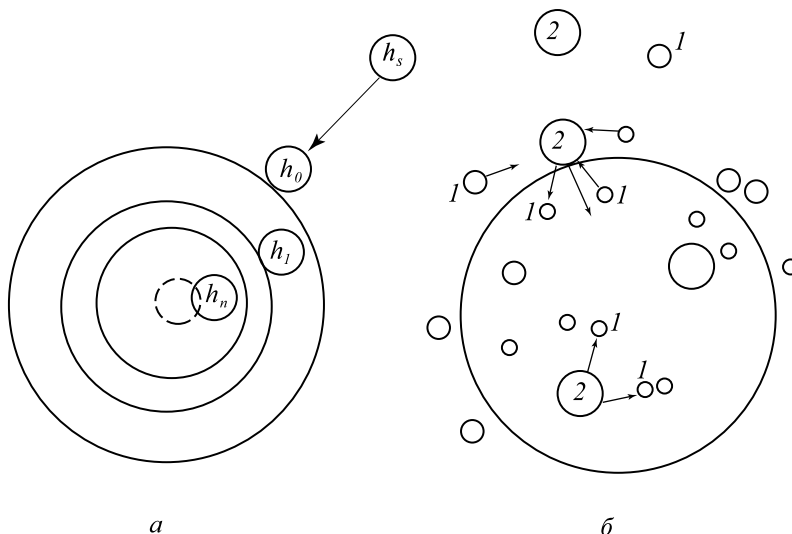


Рис. XI.24

Дырочно-слоистая (а) и дырочно-рекомбинационная (б) модели для описания растворителя на динамику глобулы (по Шайтану)

а — дырки h_s , обеспечивающие самодиффузию молекул растворителя, сорбируются на поверхности глобулы и послойно проникают внутрь за счет взаимодействия с подвижными группами
б — большие дырки типа 2 образуются за счет рекомбинации малых дырок типа 1, которые свободно диффундируют в глобуле. Дырка типа 2 необходима для конформационных движений и проникает внутрь глобулы только в обмен на эквивалентное число дырок типа 1. Диффузия дырки типа 2 происходит внутри глобулы одновременно с соответствующими микроконформационными движениями. После нескольких диффузионных актов дырка 2 может распасться на эквивалентное количество дырок типа 1. На всех стадиях свободный объем глобулы сохраняется.

конформационные переходы невозможными. Аналогично, конформационные движения во втором слое, приводящие там к образованию и схлопыванию «дырки» в первом слое и т. д. Таким образом, образование флуктуационных полостей внутри глобулы происходит за счет каскада зацепляющихся случайных процессов. Суммарный процесс можно трактовать как диффузию «дырки» из растворителя в глобулу. Микровязкость в такой системе фактически определяется концентрацией и подвижностью «дырок». Решая соответствующую систему кинетических уравнений можно найти, что влияние растворителя на микровязкость убывает при переходе к более глубоким слоям.

Конформационная подвижность осуществляется, в основном, за счет перерас-

предела свободного объема, образуемого внутри глобулы при диффузии дырок. В простейшем случае этот процесс может быть смоделирован диффузией и взаимодействием двух сортов «дырок», которые условно назовем маленькими a и большими b . Образование больших дырок необходимо для осуществления конформационных движений. Маленькие дырки ответственны за мелкомасштабные флуктуации и могут относительно свободно диффундировать из растворителя в глобулу и обратно. Динамика флуктуаций в глобуле описывается диффузией соответствующих дырок. Существенно, что большие дырки образуются за счет рекомбинации, например, двух маленьких дырок, поставляемых растворителем, $a + a \rightarrow b$, что наиболее вероятно на границе глобулы и растворителя. Образовавшись на поверхности глобулы, дырка « a » далее диффундирует внутрь глобулы, занимая там объем двух дырок типа a , которые выходят из глобулы в раствор. Внутри глобулы возможен процесс диссоциации: $b \rightarrow a + a$. Во всех перечисленных актах объем глобулы остается неизменным.

Итак, структурная организация белковой глобулы вносит определенное своеобразие в ее флуктуационное поведение. Имеется набор конформационных степеней свободы с полными амплитудами движения до нескольких ангстрем, с резко различающимися временами корреляции. Флуктуации жестких элементов каркаса имеют определенную форму, задаваемую их равновесной геометрией и условиями на границах. Все конформационные движения происходят по механизму ограниченной диффузии. Влияние растворителя на времена релаксации обусловлено диффузией «дырок» внутрь глобулы. В столь сложных структурах конформационные степени свободы имеют также и ряд дополнительных особенностей, которые связаны с тем, что форма флуктуационных полостей и щелей, необходимых для диффузии, не может быть произвольной. Проникновение частиц в щель может осуществляться лишь тогда, когда ее раскрытие превышает ван-дер-ваальсовский диаметр группы x_0 . Это приводит к тому, что жесткие элементы структуры вносят дополнительные стерические ограничения на конформационную подвижность и избирательно замедляют определенные типы движений.

Раскрытие щели не сводится только к упругой деформации ее стенок. Здесь большую роль могут играть также эффекты сольватации образующейся свободной поверхности. Изменение формы лиганда резко сказывается на необходимой величине раскрытия щели x_0 , что меняет энергию активации процесса и обеспечивает его стереоспецифичность. Влияние вязкости растворителя на скорость диффузии осуществляется через изменение микровязкости глобулы в рассматриваемом слое по механизму, описанному выше. Такой подход позволяет получать информацию и о динамике определенных белковых групп по данным о диффузии лигандов, например, СО в миоглобине.

Диффузия в структурированной среде связана с образованием определенных конформаций, необходимых, например, для функционирования фермент-субстратных комплексов (ФСК). Известно, что на поверхности ферментов имеется, как правило, участок, образованный сравнительно жесткими краями, и проникновение субстрата к активному центру связано с соответствующей «флуктуационной подгонкой» форм и размеров этого участка и субстрата. Теоретические оценки скорости этого процесса в условиях субстратного насыщения при реальных значениях упругости и микровязкости белка приводит к величинам, близким и

наблюдаемым. Наблюдается также резкое торможение процесса при увеличении диаметра субстрата больше, чем на $\sim 0,1$ нм (см. гл. XIV).

Отметим, что такой подход отличается от обычно принятого в теории активированного комплекса, где вводится константа равновесия между активной и неактивной конфигурациями и, в силу этого, теряется информация о динамике достижения этой активной конфигурации. В данном случае возникает возможность анализировать механизм сложных превращений в конденсированной среде с конформационной подвижностью, например, в случае многоцентровых ферментативных реакций (гл. XIV).

Поверхность конформационной энергии. В основе конформационной подвижности биополимеров лежат диффузионные процессы в структурированной среде. Однако реальная ситуация в белках оказывается значительно сложнее, чем это следует из моделей, описанных выше. Появление степеней свободы, связанных с вращением вокруг одинарных связей, потенциальная энергия которых имеет несколько минимумов и максимумов, резко усложняет форму гиперповерхности потенциальной энергии $U(q)$, (где q — набор N разных конформационных координат). Это справедливо даже для простейших олигопептидов. В результате появляется множество локальных минимумов и невысоких энергетических барьеров, резко расширяется объем фазового пространства, доступного системе при обычных температурах. В свою очередь это ведет к множеству топологически неэквивалентных путей, ведущих в одно и то же конформационное подсостояние на гиперповерхности потенциальной энергии.

В обычных моделях конформационные подсостояния соответствуют локальным минимумам на кривой потенциальной энергии, полученной в результате измерения какого-то единичного параметра. На самом деле, мы имеем дело лишь с одним определенным профилем потенциальной энергии вдоль одной координаты (например, угол поворота данной группы). Ему соответствует лишь один путь из всего множества путей, ведущих в данную точку конфигурационного пространства. Вдоль каждого из этих путей мы имеем определенный профиль потенциальной энергии, а каждая из множества траекторий реализуется с определенной вероятностью.

Уравнение движения в этом случае имеет вид (XI.1.8) или аналогично ему уравнения Фоккера — Планка (см. XIII.11.1)

$$\frac{\partial P(x, t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} D(x) \left\{ \frac{\partial P(x, t)}{\partial x} + \frac{1}{k_B T} P(x, t) \frac{\partial U(x)}{\partial x} \right\}, \quad (\text{XI.5.1})$$

где $P(x, t)$ — плотность вероятности нахождения частицы в точке в момент времени t ; $D(x) = D_0 \exp[-\epsilon(x)/k_B T]$ — коэффициент диффузии, зависящий от высоты барьера в точках, т. е. $\epsilon(x)$ — характер потенциальной «гребенки» на пути частицы.

Однако в отличие от обычного уравнения Фоккера — Планка для одномерного случая в (XI.5.1) коэффициент диффузии и потенциальная энергия являются случайными величинами. Вид распределения высот барьеров на пути частицы определяется деталями строения гиперповерхности потенциальной энергии и конкретным видом степени свободы. В зависимости от этого возможны весьма разнообразные динамические эффекты. Простая аррениусовская зависимость скорости перехода от T будет наблюдаться только для узких распределений, что практически означа-

ет простое строение поверхности $U(q)$ и наличие единственного пути, ведущего к данному состоянию.

Для гауссова распределения с дисперсией ε^2 получим, что энергия активации E_a конформационного перехода зависит от температуры $E_a = \varepsilon^2/k_B T$. В этом случае при понижении температуры будет наблюдаться очень резкое торможение процесса. Для других распределений имеются пороговые температуры T_c , ниже которых скорость релаксации равна нулю (при $T < T_c$). При $T > T_c$ скорость плавно растет с температурой. Все эти случаи наблюдаются в экспериментальных условиях (гл. XXVII–XXVIII).

Полезно рассматривать топологические свойства сечений гиперповерхности конформационной энергии $U(q)$ уровнями $E = NRT$. Наличие обширной связной области и ее распад на множество небольших и несвязных областей при изменении E или каких-то других условий отвечает переходу от конформационного лабильного состояния к состоянию с фиксированными конформациями. Сложность строения поверхности $U(q)$ даже в приближении сферически симметричных атом-атомных потенциалов столь велика, что фактически необходимо говорить о ее статистических свойствах. Сам по себе диффузионный характер конформационных движений далеко не исчерпывает «стохастичность» процесса, который состоит и в том, что его параметры характеризуются некоторыми функциями распределения, тесно связанными с распределением высоты барьеров $\rho_x(\varepsilon)$ при каждом значении рассматриваемой конформационной координаты x . Это значит, что параметры потенциала для рассматриваемой конформационной степени свободы оказываются зависящими от набора конформационных координат. Это делает неоднозначным результат конформационного перехода и является основой для множественности путей трансформации энергии. Изменение строения гиперповерхности в ответ на изменение химического состояния функциональных групп может быть использовано для регуляции и сопряжения на молекулярном уровне процессов переноса массы, трансформации энергии и передачи информации в биомакромолекулярных структурах.

§ 6. Нелинейные модели подвижности ДНК

Пионерской работой в области изучения внутренней динамики ДНК явилось исследование, опубликованное в 1980 г. (Englander, Kallenbach, Heeger, Krumhansl, Litwin, 1980). Методом водородно-третиевого обмена была показана принципиальная возможность образования в ДНК открытых соединений, определяемых как мобильные локальные области (длиной от одной до нескольких пар оснований), внутри которых водородные связи разорваны (рис. XI.25). Образование таких открытых состояний связано со значительными угловыми отклонениями оснований от положений равновесия.

Математически этот процесс был описан с помощью гамильтонова формализма, широко применяемого в теоретической физике. В отличие от большинства моделей, использующих гамильтонов формализм, при моделировании внутренней подвижности ДНК авторы не ограничились моделированием малых отклонений от положения равновесия (гармоническое или линейное приближение), а рассмотрели движения большой амплитуды (ангармоническое или нелинейное приближение).

Было показано, что нелинейные волновые решения уравнения синус-Гордона

$$\varphi_{tt} - \varphi_{zz} + \sin \varphi = 0 \quad (\text{XI.6.1})$$

являются теми математическими образами, которые могут имитировать открытые состояния ДНК. Здесь функция $\varphi(z, t)$ описывает угловые отклонения оснований от положений равновесия.

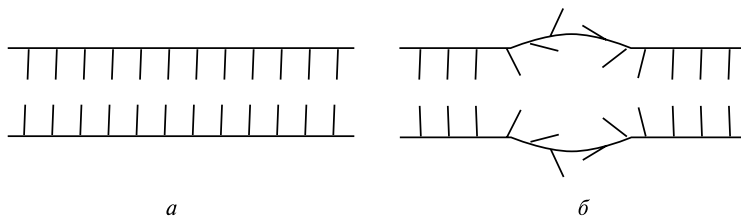


Рис. XI.25

Закрытое (а) и открытое (б) состояния двойной цепи ДНК

Классификация движений молекулы ДНК, обладающей целым набором разнообразных типов движений, приведена в таблице XI.1.

Общая картина внутренней подвижности ДНК очень разнообразна. Она включает движения отдельных атомов, небольших атомных групп, целых фрагментов двойной спирали. Есть движения быстрые и медленные, движения большой и малой амплитуды, простые движения, такие как небольшие смещения атомных групп, и сложные движения, такие как локальное расплетание двойной спирали или переход некоторого локального участка ДНК в другое конформационное состояние. Особый интерес представляют движения, характерные времена которых находятся в наносекундном и микросекундном диапазоне. Наносекундному диапазону соответствуют ограниченные движения и колебания таких групп как сахарные остатки, основания, фосфаты, а также вращательные и изгибные движения двойной спирали. Для активации этих движений необходима энергия порядка нескольких ккал/моль, они характеризуются частотой порядка нескольких с^{-1} . Если эти движения имеют достаточно большую амплитуду, становится возможным зарождение коллективных движений, связанных с образованием открытых состояний и расплетанием двойной спирали, для которых характерны уже миллисекундные времена.

Для построения математической модели особенно плодотворным оказалось изучение модельной механической системы с аналогичным набором структурных элементов, движений и взаимодействий.

Существуют сотни различных моделей, описывающих движения ДНК наносекундного диапазона. Это континуальные и дискретные модели, модели «спиральные» и игнорирующие спиральную структуру, имитирующие движение почти каждого атома фрагмента, и имитирующие движения только основных субединиц, однородные модели, и модели, учитывающие наличие последовательности оснований. Схематически уровни иерархии приведены на рис. XI.26 (Yakushevich, 1998).

Таблица XI.1. Классификация экспериментальных и теоретических данных по внутренней подвижности ДНК

Временные диапазоны	Основные типы внутренних движений и их амплитуды	Энергия активации, источники энергии	Экспериментальные методы изучения движений	Теоретические методы изучения движений
пико-секундный	колебания атомов с амплитудами $A \simeq 10^{-1} \text{ \AA}$	$E \simeq 0,6$ ккал/моль, источник — внешний тепловой резервуар	ЯМР, Раман-спектроскопия, рентгеновская спектроскопия	гармонический анализ, решеточная модель, методы молекулярной динамики
нано-секундный	изгибные и вращательные движения двойной цепи; ограниченные движения и колебания малых групп атомов: сахаров, фосфатов и оснований ($A \simeq 5 \div 7 \text{ \AA}$)	$E \simeq 2 \div 5$ ккал/моль; источник: столкновения с «горячими» молекулами раствора	Раман-спектроскопия, ЯМР, ЭПР, флюоресценция	гармонический анализ, методы молекулярной динамики, модель эластичного стержня
микро-секундный	изгибные движения; локальное скручивание и раскручивание двойной спирали; раскрытие пар оснований	$E \simeq 5 \div 20$ ккал/моль; источники: изменение pH; изменение температуры; действие денатурирующих агентов	оптическая анизотропия, реакция с формальдегидом, водородный обмен, ЯМР, ЭПР	методы конформационной механики, топологические модели
милли-секундный	диссоциация двойной спирали; изменение суперскрученности; вращение молекулы как целого	$E \simeq 10 \div 50$ ккал/моль; источники: взаимодействие с белками и другими лигандами	реакция с формальдегидом, водородный обмен, ЯМР, квазиупругое рассеяние света, гидродинамические методы	
секундный	изомеризация, деление бактерий, движения с амплитудами $A = 2 \div 3 \text{ мкм}$			

Самые простые — модели эластичного стержня с круговым сечением (уровень 1 на рис. XI.26). Дискретным аналогом является цепочка связанных друг с другом дисков (или бусинок), причем каждому диску соответствует одна или несколько нуклеотидных пар. Динамика эластичного стержня хорошо известна в физике и характеризуется тремя типами внутренних движений: продольными смещениями, вращательными, или торсионными движениями и поперечными смещениями. Решением системы уравнений являются обычные плоские волны, а спектр колебаний ДНК состоит только из трех акустических ветвей: продольной, поперечной и изгибной.

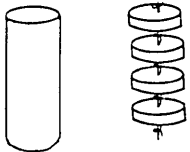
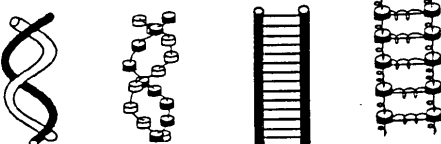
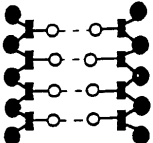
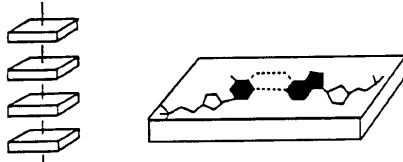
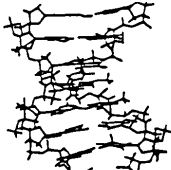
Уровни иерархии	Модели
1	
2	
3	
4	
5	

Рис. XI.26
Иерархия динамических моделей ДНК (по Yakushevich, 1998)

Модели второго уровня учитывают, что молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепочек, и потому ее можно смоделировать при помощи двух эластичных стержней, слабо взаимодействующих между собой и свернутых в двойную спираль. Дискретный аналог такой модели представляет собой две цепочки дисков, связанных друг с другом продольными и поперечными пружинами, причем жесткость продольных пружин много меньше, чем жесткость поперечных. Спектр торсионных колебаний, рассчитанных по такой (линейной) модели, состоит из двух ветвей: акустической и оптической.

Третий уровень иерархии учитывает тот факт, что каждая из цепочек состоит из трех субединиц: сахаров, фосфатов и оснований. Предполагается, что связи между отдельными субединицами слабые и мягкие, а связи между атомами внутри субединиц — прочные и жесткие. Подсчитаем число уравнений в такой модели. Если предположить, что каждая субединица имеет шесть степеней свободы, затем умножить это число на количество субединиц в нуклеотиде, равное трем, и на число цепей в ДНК, равное двум, в результате получим 36 уравнений. Если к этому добавить возможность существования двух конформационных состояний сахаров: С'-эндо и С'-экзо, то общее число уравнений увеличится до 38. Задача может быть существенно упрощена, если ограничиться моделированием лишь наиболее важных в функциональном отношении движений. Так, Волков и Козлевич (1991) ограничились описанием поперечных смещений нуклеотидов, торсионных смещений нуклеозидов и внутринуклеозидных смещений, связанных с изменением конформации сахаров, что составило всего 8 уравнений.

Четвертый уровень иерархии составляют решеточные модели ДНК, описывающие движения атомов, составляющих решеточную ячейку (Powell et al., *Phys. Rev.*, A-35, 1987). Задачи такого рода удастся решить в линейном (гармоническом) приближении и получить сложные спектры ДНК, содержащие множество ветвей.

Модели пятого уровня завершают иерархию. Они максимально точно передают структуру и движения ДНК. Сложность их математического моделирования на порядок выше, и такое моделирование возможно лишь с использованием мощных компьютеров и при существенном ограничении длины моделируемого фрагмента ДНК.

Выбор модели зависит от целей, которые ставит перед собой исследователь. Например, если решается проблема белок-нуклеинового узнавания, связанного с расплетанием двойной спирали ДНК, то модели первого уровня не годятся, так как не учитывают наличия двух цепей в ДНК. Модели второго уровня могут быть использованы только в первом приближении. Для более точного описания необходимо использовать модели третьего уровня.

Рассмотрим более подробно описанную выше модель Ингландера и ее модификации (Л. А. Якушевич) с учетом особенностей ДНК, важные для объяснения механизмов функционирования этой молекулы.

Нелинейная модель описывает процессы вращательных движений оснований вокруг сахаро-фосфатных цепочек, характеризующиеся большой амплитудой. Эти движения приводят к разрыву водородных связей и образованию открытых состояний. При описании динамических свойств используется аналогия между молекулой ДНК и цепочкой связанных маятников. Роль вращающихся маятников в молекуле ДНК играют основания, присоединенные к сахарам, роль горизонтальной цепоч-

ки — сахаро-фосфатная цепочка, роль внешнего гравитационного поля — поле, наводимое второй нитью ДНК, слабо взаимодействующей с первой через водородные связи между основаниями.

Динамика цепочки маятников хорошо изучена и описывается набором n линейных уравнений. Для n -го маятника уравнение имеет вид:

$$I \frac{d^2 \varphi_n}{dt^2} = K(\varphi_{n+1} - 2\varphi_n + \varphi_{n-1}) - mgh \sin \varphi_n, \quad (\text{XI.6.2})$$

где φ_n — угловое отклонение n -го маятника от положения равновесия, I — момент инерции маятника, K — коэффициент жесткости горизонтальной цепочки, m и h — масса маятника и его длина, соответственно, g — гравитационная постоянная. Если перейти к континуальному приближению,

$$z_n \rightarrow z, \quad \varphi_n(t) \rightarrow \varphi(z, t),$$

то можно записать уравнение для динамики вращательных колебаний оснований ДНК

$$I_0 \varphi_n - K_0 \varphi_{zz} + V_0 \sin \varphi = 0, \quad (\text{XI.6.3})$$

где I_0 — момент инерции основания, K_0 — коэффициент жесткости сахаро-фосфатной цепочки, $V_0 \sin \varphi$ — сила, действующая между основаниями внутри пар.

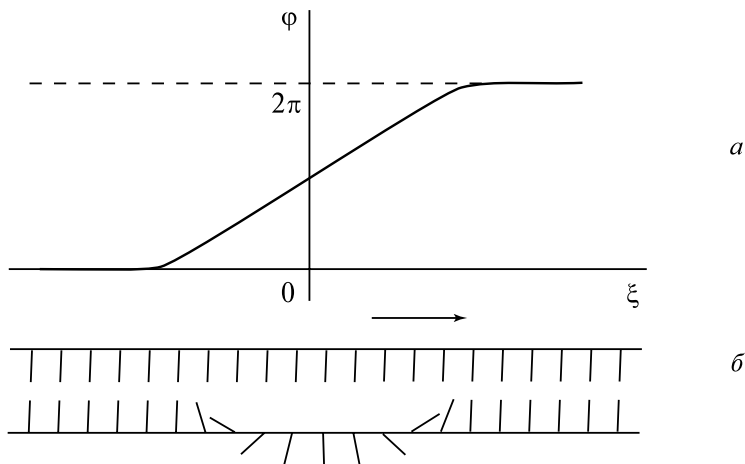


Рис. XI.27

Решение уравнения синус-Гордона в виде кинка (а) и качественная картинка, отвечающая этому решению (б) (по Yakushevich, 1998)

Это уравнение типа синус-Гордона имеет решение типа «кинк», изображенное на рис. XI.27, а,

$$\varphi(z, t) = 4 \operatorname{arctg}\{\exp(\gamma \xi / d)\}. \quad (\text{XI.6.4})$$

Здесь $\gamma = [1 - Iv^2/K_0a^2]^{-1/2}$, $\xi = z - vt$, v — скорость распространения нелинейной волны (кинка), $d = (K_0a^2/V_0)^{1/2}$, a — расстояние между ближайшими вдоль цепи парами оснований.

Качественная картина, соответствующая этому решению, приведена на рис. XI.27, б. Две сахаро-фосфатные цепочки ДНК изображены здесь двумя длинными линиями, а основания — множеством коротких линий. Кинку соответствует локальная область с разорванными парами оснований.

Описанная модель обладает одним существенным недостатком — она учитывает подвижность оснований только одной из цепочек ДНК. Вторая цепочка играет пассивную роль некоторого среднего поля. В действительности обе цепочки равноценны. Механическим аналогом является модель из двух слабо связанных эластичных стержней, дискретным аналогом является двойна цепочка дисков, связанных продольными и поперечными пружинами.

Гамильтониан такой системы состоит из трех слагаемых:

$$H = T + V^{(1)} + V^{(2)}. \quad (\text{XI.6.5})$$

Здесь T — кинетическая энергия вращательных колебаний, $V^{(1)}$ и $V^{(2)}$ — потенциальные энергии продольных и поперечных пружинок. Эти величины определяются угловым смещением, моментом инерции и радиусом дисков, а также длиной и жесткостью пружинок.

Для структуры ДНК правомерным является предположение, что радиус дисков много больше расстояния между ними. Это позволяет записать упрощенные уравнения:

$$\begin{aligned} I\varphi_{1tt} &= Ka^2\varphi_{1zz} - kR^2[2\sin\varphi_1 - \sin(\varphi_1 + \varphi_2)]; \\ I\varphi_{2tt} &= Ka^2\varphi_{2zz} - kR^2[2\sin\varphi_2 - \sin(\varphi_1 + \varphi_2)]. \end{aligned} \quad (\text{XI.6.6})$$

Здесь $\varphi_{1,2}$ — угловые смещения дисков, a — расстояние между соседними дисками, K и k — жесткости продольных и поперечных пружинок. В работах Л. В. Якушевич уравнения (XI.6.6) решены методом Хермана с помощью предварительного разложения синусов в бесконечные ряды и перехода в систему координат, движущуюся с некоторой постоянной скоростью v ,

$$\xi = z - vt.$$

Точное решение имеет вид

$$\varphi_1 = -\varphi_2 = 4 \arctg\{\exp q(\xi - \xi_0)\}. \quad (\text{XI.6.7})$$

Графическое решение и соответствующая картинка для этого уравнения приведено на рис. XI.28 а, б. Таким образом, решение (XI.6.7) описывает локальную деформацию (раскрытие пар оснований), движущуюся вдоль молекулы ДНК со скоростью v . В процессе распространения волны может наблюдаться ускорение вследствие постоянной подкачки и замедление вследствие эффектов внутреннего трения. Учет неоднородностей ДНК в виде блоков с преимущественным содержанием G-C на фоне остальной части молекулы, в основном содержащей A-T пары, позволяет оценить

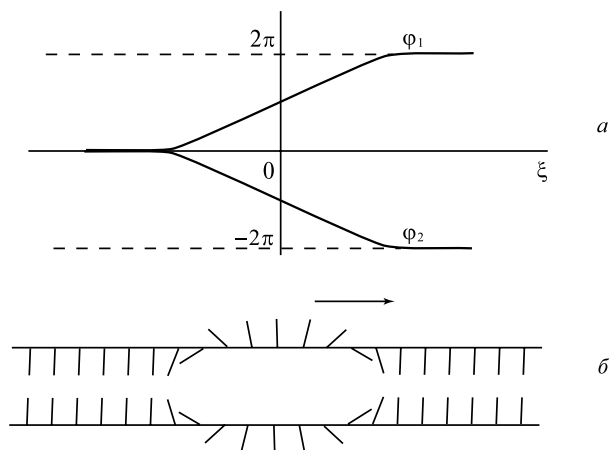


Рис. XI.28

Частное решение уравнений (XI.6.6) (а) и качественная картинка, соответствующая этому решению (б) (по Yakushevich, 1998)

минимальное значение скорости нелинейной волны, необходимое для преодоления барьера из G-C блоков и продолжения движения.



Рис. XI.29

Схематическое изображение ДНК с выделенными сайтами (S_1, S_2) и двух белковых молекул (P_1, P_2) (по Yakushevich, 1998)

Рассмотренная модель позволяет качественно объяснять эффекты дальнего действия в молекуле ДНК. Суть этих эффектов поясняет схема на рис. XI.29. Здесь изображен достаточно длинный фрагмент ДНК с двумя специфическими сайтами S_1 и S_2 и две белковые молекулы P_1 и P_2 . Многочисленные эксперименты показывают, что взаимодействие молекулы P_1 с сайтом S_1 может оказывать влияние и менять характер взаимодействия молекулы P_2 с сайтом S_2 , причем расстояние между сайтами S_1 и S_2 может быть довольно большим, порядка сотен и даже тысяч пар оснований. Именно поэтому эти эффекты называются эффектами дальнего действия. В рамках рассмотренной модели механизм такого действия может заключаться в следующем.

Связывание P_1 с сайтом S_1 приводит к локальному изменению конформации в окрестности этого сайта, и это локальное изменение (конформационная волна) начинает распространяться вдоль ДНК. Достигнув сайта S_2 , оно приведет к изменению конформации этого сайта, что, в свою очередь, приведет к изменению коэффициента связывания сайта S_2 с молекулой P_2 .

Модель также позволяет найти новый подход к решению проблемы регуляции процесса транскрипции. Этот процесс (синтез РНК) включает три основные стадии: инициацию, элонгацию и терминацию. На первой стадии специальной фер-

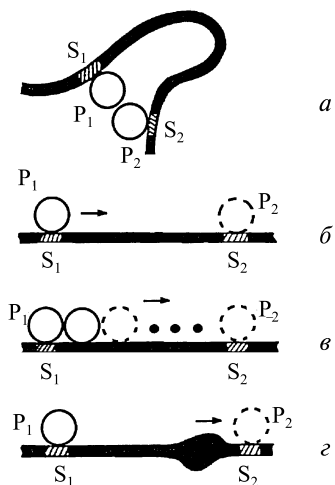


Рис. XI.30

Модели взаимодействия в ДНК (по Yakushevich, 1998):

(а) модель, объясняющая эффект дальнего действия образованием петли; (б) модель скольжения; (в) модель последовательного связывания; (г) модель, основанная на возможности распространения в ДНК конформационных волн

мент (РНК-полимераза) связывается с промоторной областью молекулы ДНК. После того, как РНК-полимераза займет правильную позицию и образует несколько фосфодиэмиридных связей, начинается вторая стадия процесса. Небольшой фермент (субединица σ) отделяется от РНК-полимеразы, а остальная ее часть движется вдоль ДНК и удлиняет шаг за шагом молекулу РНК. В третьей стадии процесс заканчивается и РНК-полимераза отделяется от молекулы ДНК. Существует специальная область молекулы ДНК (терминатор), которая дает сигнал «стоп» процессу транскрипции.

Роль нелинейных конформационных волн в этом процессе может быть описана с помощью существенно неоднородной модели ДНК (рис. XI.30). Модель содержит основные функциональные блоки, необходимые для синтеза ДНК и его регуляции: промоторную область P , кодирующую область C , несколько регуляторных областей R_1, R_2, R_3 и терминаторную область T .

На первой стадии РНК-полимераза связывается с промотором P , что сопровождается значительными изменениями конформации участка связывания, которое может передаваться по двойной цепи ДНК. Это соответствует возбуждению и распространению в ДНК нелинейной конформационной волны, прохождение которой через кодирующую область меняет конформацию этой области, что приводит к изменению матричных свойств ДНК, и, в свою очередь, к изменению скорости синтеза на стадии элонгации.

После прохождения области C конформационная волна достигает терминаторной области, обладающей сильно неоднородной структурой, которая разделяет два гена. На рис. XI.31 область T изображена в виде креста. Прохождение волны через такую область может привести к двум результатам: волна может полностью поглотиться или преодолеть этот барьер, но с измененным профилем и скоростью. Первый результат можно трактовать как терминацию, второй — как сигнал о начале процесса транскрипции во втором гене.

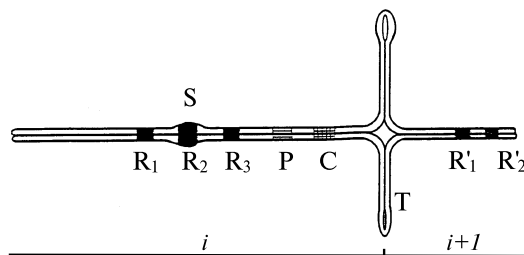


Рис. XI.31

Схематическое изображение фрагмента ДНК (по Yakushevich, 1998)

P , C и T — промотор, кодирующая область и терминатор i -го гена, соответственно; R_1 , R_2 и R_3 — регуляторные области $(i+1)$ -го гена; S — конформационное возмущение, движущееся вдоль ДНК

Распространение конформационных волн через регуляторные области R может также сопровождаться изменением конформации этих областей и, следовательно, изменением констант связывания регуляторных белков с этими областями, что имеет особенно важное значение для регуляции функциональной активности ДНК.

Нелинейные конформационные волны, движущиеся вдоль ДНК, могут также играть роль в координации работы нескольких генов.