

На правах рукописи

**ЯКУБОВИЧ АЛЕКСАНДР ВАЛЕНТИНОВИЧ**

**КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ  
В БЕЛКАХ И ПОЛИПЕПТИДАХ**

Специальность 01.04.02 – теоретическая физика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург

2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН.

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук

Соловьев А. В.

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, профессор,

Санкт-Петербургский государственный

политехнический университет

Иванов В. К.

доктор физико-математических наук, профессор,

Российский государственный педагогический

университет им. А. И. Герцена

Беляев А. К.

Ведущая организация:

Санкт-Петербургский государственный университет

Защита состоится 17 февраля 2011 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 002.205.02 при Учреждении Российской академии наук Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН по адресу: 194021, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН.

Автореферат разослан 14.01.2011

Ученый секретарь диссертационного совета:

доктор физико-математических наук

Сорокин Л. М.

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Белки - высокомолекулярные органические вещества, молекулы которых построены из аминокислот, число которых варьируется от сотен до десятков тысяч. Белки играют центральную роль в жизнедеятельности живых организмов разной сложности - от простейших вирусов до человека. Они вовлечены почти во все жизненные процессы клетки и выполняют разнообразные функции: каталитическую, строительную, защитную, регуляторную, сигнальную, транспортную, моторную, рецепторную и т.д. В клетке каждая молекула белка синтезируется на рибосомах в виде линейной цепочки аминокислот, которая определяется мРНК, транскрибируемой с гена. Чтобы стать биологически активными, большинство протеинов должно свернуться в трёхмерные структуры. Процесс спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную пространственную структуру (так называемая третичная структура) получил название фолдинга. Ещё в 1925 году Ансон (*Anson*) и Мирский (*Mirsky*) предположили, что процесс денатурации белков может быть обратим. В начале 60-х годов эта гипотеза была подтверждена Анфинсеном (*Anfinsen*) в эксперименте по рефолдингу денатурированной рибонуклеазы *in vitro* [1, 2], и, независимо от него, Исемурой (*Isemura*), показавшим возможность самостоятельной ренатурации фермента такаамилазы [3]. На основании этих и аналогичных работ было предложено описание процесса сворачивания белка как фазового перехода в отдельной молекуле [4]. Определим свернутое и развернутое состояние белка как две различные фазы системы. Тогда при изменении температуры, система переходит из одного состояния в другое и наоборот. Процесс сворачивания сопровождается выделением или поглощением определённого количества энергии [5], что соответствует фазовому переходу первого рода.

Выяснение механизмов фолдинга является одной из важнейших проблем современной физики и структурной биологии [6]. Решение этой задачи даст возможность предсказывать нативные конформации белков на основании данных об их аминокислотных последовательностях, реконструируемых на основании относительно легко доступных ДНК-последовательностей, синтезировать новые последовательности с заданными свойствами для целей медицины и нанотехнологии. Например, для создания новых систем доставки лекарственных препаратов, для изучения проблемы протеиновой агрегации и образова-

ния амилоидных бляшек, ассоциированных с различными заболеваниями, в частности, болезнью Альцгеймера и др.

Существуют различные способы описания перехода сворачивания↔разворачивания белков и их фрагментов - полипептидов. Одна из первых работ, посвященных статистическо-механическому описанию перехода  $\alpha$ -спираль↔клубок в полипептидах была выполнена Циммом (*Zimm*) и Браггом (*Bragg*) в 60-х годах прошлого века [7]. С тех пор был достигнут существенный прогресс в понимании процесса сворачивания белков. С современным состоянием науки в области сворачивания белков можно ознакомиться, например, в недавнем обзоре Дилла (*Dill*) [8] и в ссылках внутри него.

Все теоретические работы, посвящённые сворачиванию белков, можно разбить приблизительно на три класса: “чисто” теоретические, эмпирические и вычислительные. Несмотря на огромный рост возможностей компьютеров за последние десятилетия, сложность процесса сворачивания белка не позволяет решить эту проблему вычислительно. Однако, в последнее время достигнут прогресс в предсказании нативной структуры белков, понимании поверхностей потенциальной энергии белков и полипептидов, и т.д. Основная проблема “чисто” теоретических работ заключается в том, что они посвящены описанию значительно упрощенных моделей белков. Поэтому результаты таких теоретических работ могут быть использованы только для понимания фундаментальных физических процессов, сопровождающих фазовый переход в белках, но не для предсказания свойств конкретных молекул белков. Эмпирические методы предсказывают свойства нового белка на основе анализа базы экспериментальных данных белков, имеющих схожую структуру. Однако, область точность эмпирических моделей для конкретной системы часто являются слабыми местами такого подхода. В настоящей работе описан способ, комбинирующий преимущества вышеупомянутых теоретических методов, и построена теоретическая модель, основанная на фундаментальных физических принципах, описывающая конформационные переходы в белках и их фрагментах - полипептидах.

Целью работы является:

1. Изучение поверхностей потенциальной энергии небольших фрагментов белков, полипептидов, на основе квантово-механических методов.
2. Определение наиболее энергетически выгодных конформаций полипеп-

тидов и расчёт характерных времён переходов между различными конформационными состояниями молекулы полипептида.

3. Разработка теоретического метода для описания перехода спираль $\leftrightarrow$ клубок в полипептидах аланина различной длины.

4. Изучение конформационного перехода свернутое $\leftrightarrow$ развёрнутое состояние в полипептидах и белках, находящихся в водном растворе. Определение влияния растворителя на свойства конформационных переходов.

Научная новизна работы состоит в решении следующих задач:

1. С использованием теории функционала плотности рассчитаны поверхности потенциальной энергии полипептидов аланина и глицина в различных конформациях, состоящих из 3 и 6 аминокислот. Определены основные степени свободы молекулы ответственные за конформационные переходы.

2. На основе рассчитанных поверхностей потенциальной энергии построена статистическая сумма полипептида и определены термодинамические характеристики системы.

3. В рамках молекулярной динамики исследован переход спираль $\leftrightarrow$ клубок в полипептидах аланина различной длины.

4. Проведено сравнение результатов разработанной статистическо-механической модели, описывающей фазовый переход в полипептидах, с результатами расчётов на основе молекулярной динамики.

5. Построена статистическая сумма однодоменного белка в водном окружении.

6. Произведено сравнение разработанной теоретической модели, описывающей конформационные переходы в белках, с результатами экспериментальных измерений зависимости теплоёмкости от температуры для метмиоглобина и стафилококковой нуклеазы.

Практическая значимость работы. С использованием точных методов квантовой механики рассчитаны поверхности потенциальной энергии полипептидов аланина и глицина как функции двугранных углов  $\varphi$ ,  $\psi$  и  $\omega$ . Данные поверхности потенциальной энергии могут быть использованы для определения характерных высот энергетических барьеров и времён, соответствующих переходам между различными конформационными состояниями молекулы, и для определения уровня точности различных модельных потенциалов, например потенциала молекулярной механики.

Разработана теоретическая модель, описывающая сворачивание и развора-

чивание белков в водном окружении. Результаты, полученные с помощью теоретической модели, хорошо согласуются с результатами экспериментальных измерений, что открывает возможности для использования разработанной модели для предсказания влияния мутаций на конформационную стабильность белков, а также для дизайна белков и белково-подобных полимеров с заданными термодинамическими характеристиками. С определёнными изменениями предложенная теоретическая модель сворачивания белков может быть также обобщена для описания образования функциональных комплексов белков, изучения процессов белковой агрегации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. На основе рассчитанных поверхностей потенциальной энергии полипептидов аланина и глицина определены характерные времена переходов между наиболее энергетически выгодными конформациями молекул.

2. Разработана теоретическая модель, описывающая переход спираль $\leftrightarrow$ клубок в полипептидах аланина. В работе показано, что для построения статистической суммы полипептида необходимо знать только поверхность его потенциальной энергии как функцию мягких степеней свободы молекулы, а именно двугранных углов  $\varphi$  и  $\psi$ .

3. Разработанная теоретическая модель хорошо согласуется с другими теоретическими моделями, описывающими переход спираль-клубок, однако, в отличие от предыдущих работ, предложенная модель не содержит свободных параметров.

4. Построена теоретическая модель сворачивания белков в водной среде. Сравнение теоретически рассчитанных результатов зависимости теплоёмкости белков с результатами экспериментальных измерений показывают высокую точность предложенной модели в широком диапазоне температур.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на семинарах и коллоквиумах в Физико-Техническом институте им. Иоффе РАН, а также в Goethe Universitaet и Frankfurt Institute for Advanced Studies (Франкфурт на Майне). Также результаты работы были представлены на следующих международных конференциях:

1. Symposium on Size Selected Clusters, 2007, Brandt, Austira
2. Moscow Conference on Computational Molecular Biology, 2007, Moscow, Russia

3. International Symposium Atomic Cluster Collisions: structure and dynamics from the nuclear to the biological scale, 2007, Darmstadt, Germany
4. International Conference on Theoretical Physics, 2008, Dubna, Russia
5. International Symposium Atomic Cluster Collisions: structure and dynamics from the nuclear to the MesoBioNano scale, 2008, St.Petersburg, Russia
6. International Symposium on Nanofusion, 2009, London, United Kingdom
7. Symposium on Size Selected Clusters, 2009, Brandt, Austira
8. 2nd ITS LEIF Winter School, 2009, Morzine, Haute-Savoie, France
9. DPG Fruhjahrstagung, 2009, Dresden, Germany
10. International Symposium Atomic Cluster Collisions: structure and dynamics from the nuclear to the biological scale, Ann Arbor, MI, USA
11. Physical Principles of Protein Behavior in the Cell, International Workshop, 2009, Dresden, Germany
12. European Conference on Atoms Molecules and Photons, 2010, Salamanca, Spain

и других конференциях

Публикации. По результатам исследований, проведённых в диссертации, опубликовано 14 статей (их список приведён в конце автореферата).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и списка литературы. Диссертация содержит 165 страниц текста, включая 42 рисунка и 9 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 123 наименования.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы исследований, сформулированы цель и научная новизна работы, перечислены положения, выносимые на защиту, а также кратко изложено содержание диссертации.

**Первая глава** “Теоретические Методы” посвящена краткому описанию основных теоретических методов квантовой механики и молекулярной динамики, которые используются в работе.

В первых 4 секциях первой главы приведён обзор метода Хартри-Фока (*Hartree-Fock*) и представлен общий вид стандартных базисных функций, которые используются при численном решении уравнения Хартри-Фока. В секции 5 представлен общий вид уравнения Кона-Шама (*Kohn-Sham*), которое учитывает локальный обменно-корреляционный функционал. Также в секции 5 приведён вид обменно-корреляционных функционалов, которые использовались в данной работе, а именно функционал Гуннарсона-Люндквиста (*Gunnarsson-Lundqvist*), Ли-Янг-Парра (*Lee-Yang-Parr*) и функционал Воско-Вилк-Нусаира (*Vosko-Wilk-Nusair*).

В секции 6 первой главы приведен так называемый феноменологический потенциал молекулярной механики. В модели молекулярной механики все взаимодействия между атомами в системе описываются с помощью особого классического, а не квантового потенциала. Описание энергии системы как функции координат ядер атомов с помощью потенциала молекулярной механики позволяет кардинальным образом упростить проблему численного вычисления энергии системы в заданной конформации. Феноменологическое описание белков на основе потенциала молекулярной механики численно настолько эффективно, что позволяет не только рассчитывать энергию различных конформаций белка, но и описывать динамическое поведение биологических макромолекулярных комплексов, состоящих из миллионов атомов [9].

В секции 7 приведен краткий обзор метода молекулярной динамики, который использовался в данной работе для изучения переходов спираль $\leftrightarrow$ клубок в различных полипептидах.

**Вторая глава** “Степени свободы в полипептидах и белках” посвящена исследованию поверхностей потенциальной энергии небольших фрагментов белков, полипептидов, как функций различных степеней свободы молекул. Приведенные во второй главе расчеты выполнены на основе теории функционала плотности с учетом всех электронов в системе.

В секции 1 изложен обзор литературы, посвященной квантово-механическим расчетам полипептидов. В секции 2 и 3 приведены результаты расчетов потенциальных поверхностей полипептидов аланина и глицина, соответственно.

Поверхности потенциальной энергии полипептидов аланина и глицина рассчитаны как функции двугранных углов  $\varphi$  и  $\psi$  (рис. 1). На основе расчетов поверхностей потенциальной энергии определены различные конформацион-



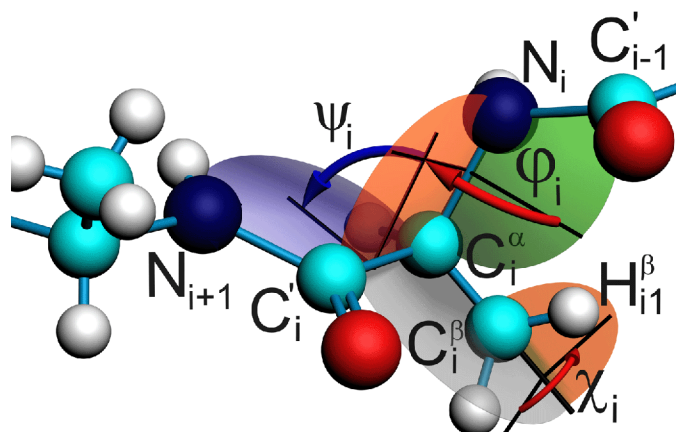


Рис. 1: Двугранные углы  $\varphi$  и  $\psi$ , которые используются для описания вторичной структуры полипептидной цепи. Двугранный угол  $\chi_i$  описывает вращение бокового радикала вдоль связи  $C_i^\alpha - C_i^\beta$ .

ные состояния полипептидов, рассчитаны барьеры переходов между различными конформационными состояниями. С использованием уравнения Аррениуса определены характерные времена переходов между конформациями. Проведено сравнение результатов простой модели на основе уравнения Аррениуса с результатами трудоемких расчетов с использованием квантовой молекулярной динамики. Сравнение показало высокую точность примененного метода расчета характерных времен переходов.

Проведенный во второй главе расчет поверхностей потенциальной энергии полипептидов аланина и глицина показал, что в данных молекулах можно выделить две различные группы степеней свободы молекулы. Первой группе так называемых *жестких* степеней свободы соответствуют колебания атомов вдоль ковалентных связей, и колебания, связанные с изменением плоских углов в ковалентных связях. Характерная энергия, необходимая для значительного изменения геометрической структуры молекулы при вариации какой либо из жестких степеней свободы, составляет несколько электронвольт. Второй группе так называемых *мягких* степеней свободы соответствует набор двугранных углов  $\varphi$  и  $\psi$ . Характерная высота барьеров, соответствующих переходам между различными конформациями молекулы при изменении углов  $\varphi$  и  $\psi$ , составляет несколько сотых электронвольта. Возможность разделения степеней свободы молекулы на мягкие и жесткие позволяет кардинальным образом упростить статистическо-механическое описание конформационных переходов

в полипептидах. Построению теории, описывающей конформационные переходы в полипептидах на основе статистической механики, посвящена третья глава диссертации.

В третьей главе “Статистическая модель” приведена разработанная теоретическая модель, описывающая конформационный переход спираль↔клубок в полипептидах, см. рис. 2.

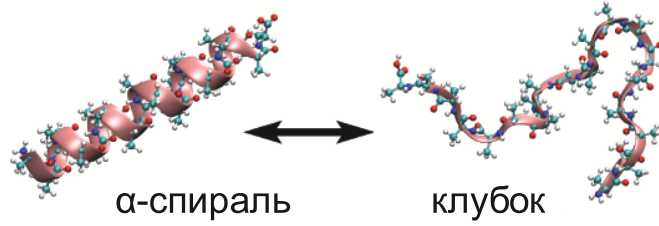


Рис. 2: Характерные структурные изменения в полипептиде при фазовом переходе  $\alpha$ -спираль↔статистический клубок.

Разработанная теоретическая модель конформационного перехода основывается на построении статистической суммы системы без использования каких-либо свободных параметров. В секции 3 третьей главы производится построение Гамильтониана полипептидной цепи, который в общем виде строится как сумма потенциальной, кинетической и колебательной энергий полипептида.

Произведя разделение движений в системе, соответствующих жестким и мягким степеням свободы и опуская промежуточные выкладки, Гамильтониан полипептида может быть записан следующим образом:

$$H = \frac{\mathbf{P}^2}{2M} + \frac{1}{2} (I_1\Omega_1^2 + I_2\Omega_2^2 + I_3\Omega_3^2) + \sum_{i=1}^{l_h} \left( \frac{(\tilde{p}_i^h)^2}{2\mu_i^h} + \frac{\mu_i^h\omega_i^2 (\tilde{q}_i^h)^2}{2} \right) + \sum_{i=1}^{l_s} \sum_{j=1}^{l_s} g_{ij} \frac{p_i^s p_j^s}{2} + U(\{\chi\}) + U(\{\varphi, \psi\}), \quad (1)$$

где  $\mathbf{P}$ ,  $M$ ,  $I_{1,2,3}^{(j)}$ ,  $\Omega_{1,2,3}$  - это импульс всего полипептида, его масса, три главных момента инерции и частоты вращения, соответственно.  $q^s$  и  $q^h$  - обобщенные координаты, соответствующие жестким и мягким степеням свободы, а  $p^s$  и  $p^h$  - соответствующие им обобщенные импульсы.  $l_s$  и  $l_h$  - число жестких и мягких степеней свободы, соответственно.  $1/g_{ij}$  имеет значение обобщенной массы.  $\omega_i$  и  $\mu_i^h$  - частота  $i$ -ой жесткой нормальной моды и соответствующая обобщенная масса. Последние два члена в уравнении (1) описывают потенциальную

энергию системы как функцию от мягких степеней свободы. Для каждой аминокислоты существуют две мягкие степени свободы, соответствующие углам  $\varphi_i$  и  $\psi_i$  (рис. 1). Некоторые дополнительные мягкие степени свободы возникают в боковых радикалах аминокислот. Типичный пример - угол  $\chi_i$ , который описывает вращение бокового радикала вдоль связи  $C_i^\alpha - C_i^\beta$  (рис. 1). Набор этих двугранных углов задает набор мягких степеней свободы полипептида:  $\{q^s\} \equiv \{\chi, \varphi, \psi\}$ . Применимость использованных при построении Гамильтониана допущений подробно обсуждается в секции 1 главы 3.

Зная Гамильтониан системы как функцию всех ее координат, можно построить статистическую сумму. Построение статистической суммы полипептида, который может находиться в различных конформационных состояниях, приведено в секции 2 третьей главы.

Опуская промежуточные выкладки, статистическая сумма полипептида в общем виде может быть записана как:

$$\mathbb{Z} = A \cdot B(kT) \cdot (kT)^{3N-3-\frac{1s}{2}} \sum_{j=1}^{\xi} \prod_{i=1}^n \int_{-\pi}^{\pi} \int_{-\pi}^{\pi} \exp\left(-\frac{\epsilon_i^{(j)}(\varphi, \psi)}{kT}\right) d\varphi d\psi, \quad (2)$$

где  $\epsilon_i^{(j)}(\varphi, \psi)$  - потенциальная энергия  $i$ -той аминокислоты в полипептиде, который находится в одной из  $\xi$  конформаций, обозначенных как  $j$ ;  $n$ ,  $k$  и  $T$  - общее число аминокислот в полипептиде, константа Больцмана и температура, соответственно. Потенциальная энергия аминокислоты является функцией двугранных углов  $\varphi$  и  $\psi$ .  $A$  и  $B(kT)$  - константа и функция, слабо меняющаяся в диапазоне температур 100..1000 К, соответственно. Явный вид  $A$  и  $B$  также приведен в секции 2 главы 3.

Финальное выражение для статистической суммы полипептида из  $n$  одинаковых аминокислот, совершающего переход спираль  $\leftrightarrow$  клубок, может быть записано в следующем виде:

$$\mathbb{Z} = A \cdot B(kT) \cdot (kT)^{3N-3-\frac{1s}{2}} \left[ \beta Z_b^{n-1} Z_u + \beta \sum_{i=1}^{n-4} (i+1) Z_b^{n-i-1} Z_u^{i+1} + \right. \quad (3) \\ \left. Z_u^n + \sum_{i=2}^{(n-3)/2} \beta^i \sum_{k=i}^{n-i-3} \frac{(k-1)!(n-k-3)!}{i!(i-1)!(k-i)!(n-k-i-3)!} Z_b^{k+3i} Z_u^{n-k-3i} \right].$$

Здесь первый и третий члены в квадратных скобках описывают статсумму полипептида в фазе  $\alpha$ -спирали и статистического клубка, соответственно. Вто-

рой член учитывает возможность сосуществования двух фаз. Суммирование во втором члене в (3) производится до  $n - 4$ , так как самая короткая  $\alpha$ -спираль состоит из четырех аминокислот. Последний член в квадратных скобках учитывает ситуацию перемешивания фаз. Как показывает расчет, вклад четвертого члена в статсумму становится существенным лишь для больших полипептидов, состоящих из более чем 100 аминокислот. Для описания фазового перехода в небольших полипептидах этот член может быть опущен.  $Z_b$  и  $Z_u$  - вклады в статсумму каждой аминокислоты, находящейся либо в связанном, либо в несвязанном состоянии, соответственно.  $\beta$  - фактор, учитывающей потерю энтропии при инициации спирали. Выражения для  $Z_b$ ,  $Z_u$  и  $\beta$  имеют следующий вид:

$$Z_b = \int_{-\pi}^{\pi} \int_{-\pi}^{\pi} \exp\left(-\frac{\epsilon^{(b)}(\varphi, \psi)}{kT}\right) d\varphi d\psi \quad (4)$$

$$Z_u = \int_{-\pi}^{\pi} \int_{-\pi}^{\pi} \exp\left(-\frac{\epsilon^{(u)}(\varphi, \psi)}{kT}\right) d\varphi d\psi \quad (5)$$

$$\beta = \left( \int_{-\pi}^{\pi} \int_{-\pi}^{\pi} \exp\left(-\frac{\epsilon^{(b)}(\varphi, \psi) + \epsilon^{(u)}(\varphi, \psi)}{kT}\right) d\varphi d\psi \right)^3, \quad (6)$$

где  $\epsilon^{(b)}(\varphi, \psi)$  и  $\epsilon^{(u)}(\varphi, \psi)$  потенциальная энергия аминокислоты, находящейся в связанном или несвязанном состоянии, соответственно. Подставляя (4), (5) и (6) в уравнение (3), получаем итоговое выражение для статсуммы полипептида, совершающего фазовый переход  $\alpha$ -спираль  $\leftrightarrow$  статистический клубок.

$\epsilon^{(b)}(\varphi, \psi)$  и  $\epsilon^{(u)}(\varphi, \psi)$  определяют статсумму полипептида. Эти зависимости могут быть рассчитаны из первых принципов, например на основе теории функционала плотности.

Зная статистическую сумму полипептида, можно вычислить температурную зависимость всех его термодинамических характеристик. В частности, вычислить зависимости полной энергии, теплоемкости и спиральности полипептида от температуры. Вычислению этих характеристик молекулы и сравнению полученных зависимостей с результатами расчетов на основе молекулярной динамики посвящена четвертая глава диссертации.

**Четвертая глава** “Фазовые переходы в полипептидах” начинается с обсуждения точности так называемого потенциала молекулярной механики, который использовался для молекулярно-динамических расчетов. На основе сравнения потенциала молекулярной механики с квантово-механическими рас-

четами было показано, что потенциалы молекулярной механики хороши больше для качественного описания процессов в сложных молекулярных системах, нежели для точных количественных исследований.

В секции 2 главы 4 приведены результаты расчета поверхностей потенциальной энергии полипептидов аланина. Каждая аминокислота в центре полипептида формирует две водородные связи. Однако, так как в этих связях участвуют две аминокислоты, то эффективно существует лишь одна водородная связь на каждую аминокислоту. Поэтому, для определения поверхности потенциальной энергии одной аминокислоты в связанной,  $\epsilon^{(b)}(\varphi, \psi)$ , и несвязанной,  $\epsilon^{(u)}(\varphi, \psi)$ , конформации используется поверхность потенциальной энергии второй аминокислоты в полипептиде, т.к. именно эта аминокислота образует лишь одну водородную связь с соседними аминокислотами.

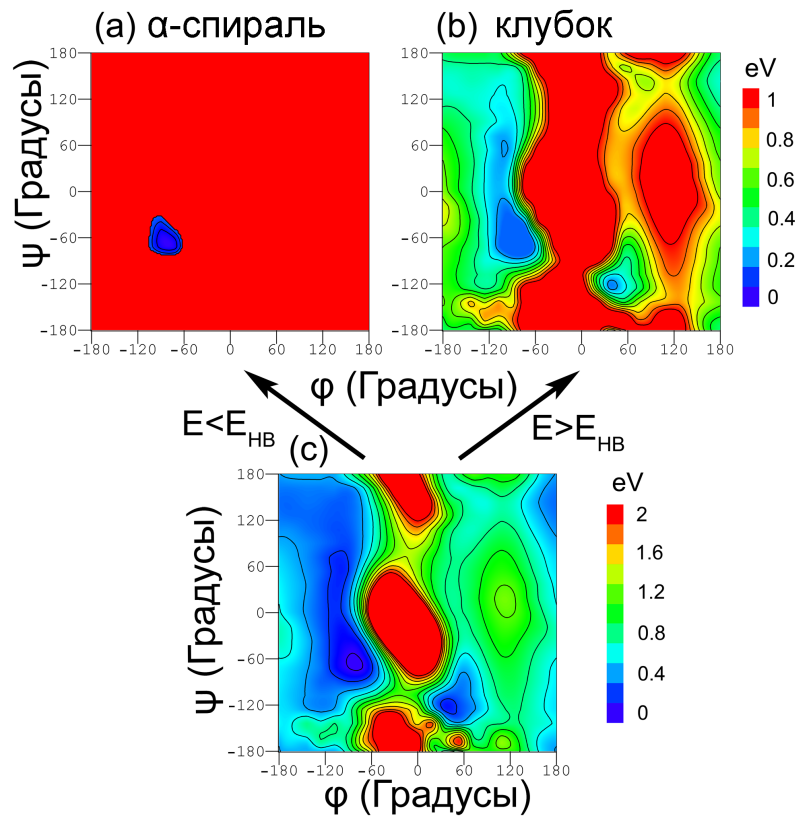


Рис. 3: Поверхность потенциальной энергии аланина в конформации  $\alpha$ -спирали (а) и статистического клубка (б). И поверхность потенциальной энергии для второй аминокислоты в полипептиде (с), которая используется для построения поверхностей потенциальной энергии аланина в конформации  $\alpha$ -спирали и клубка. Часть поверхности потенциальной энергии, показанной на графике (с) с энергией меньше  $E_{NB}$  соответствует конформации спирали, а часть с энергией больше  $E_{NB}$  соответствует состоянию клубка.

Поверхность потенциальной энергии второй аминокислоты имеет глобальный минимум при  $\varphi = -81^\circ$  и  $\psi = -66^\circ$ , который соответствует связанной конформации (рис. 3а). Поэтому часть поверхности потенциальной энергии вблизи этого минимума соответствует поверхности потенциальной энергии связанного состояния аминокислоты. Связанное состояние аминокислоты вызвано образованием водородной связи, энергия которой для аланина равна  $E_{HB} = 0.142$  эВ. Это значение получено из разницы энергий между глобальным минимумом и энергией плато при  $\varphi \in (-90^\circ.. -100^\circ)$  и  $\psi \in (0^\circ..60^\circ)$ . Следовательно, часть поверхности потенциальной энергии с энергией меньше  $E_{HB}$  соответствует связанному состоянию аминокислоты, а часть с энергией больше  $E_{HB}$  - несвязанному (см. Рис. 3).

Секция 3 посвящена сравнению результатов разработанной теоретической модели с результатами расчетов на основе молекулярной динамики.

Зависимость теплоемкости полипептидов аланина от температуры представлена на Рис. 4. Результаты, полученные с использованием статистического подхода, показаны толстой сплошной линией, а результаты, полученные на основе молекулярной динамики, - тонкой линией. Пунктирной линией показаны результаты, полученные на основе формализма Цимма-Брагга [7].  $C_{300}$  обозначает теплоемкость при 300 К°.

Из рис. 4 видно, что результаты статистической модели находятся в достаточно хорошем согласии с результатами молекулярной динамики. Возможные причины различия результатов детально обсуждаются в тексте диссертации.

Также в главе 4 обсуждается зависимость спиральности полипептида от температуры. Спиральность - доля аминокислот биомолекулы, находящихся в конформации спирали. Спиральность полипептидов может выступать в роли параметра порядка для перехода спираль $\leftrightarrow$ клубок.

Отдельная секция главы 4 посвящена сравнению разработанной теории с результатами других теоретических работ. В частности, в диссертации произведен расчет параметров феноменологической модели Цимма-Брагга, которая широко использовалась для описания перехода спираль-клубок. Основное отличие разработанной теоретической модели от предыдущих работ в том, что предложенная теория не содержит модельных параметров, в то время как предыдущие работы основывались на нескольких варьируемых параметрах.

В **пятой главе** “Сворачивание полипептидов и белков в водной среде” произведено существенное обобщение теории, описывающей переход спираль-

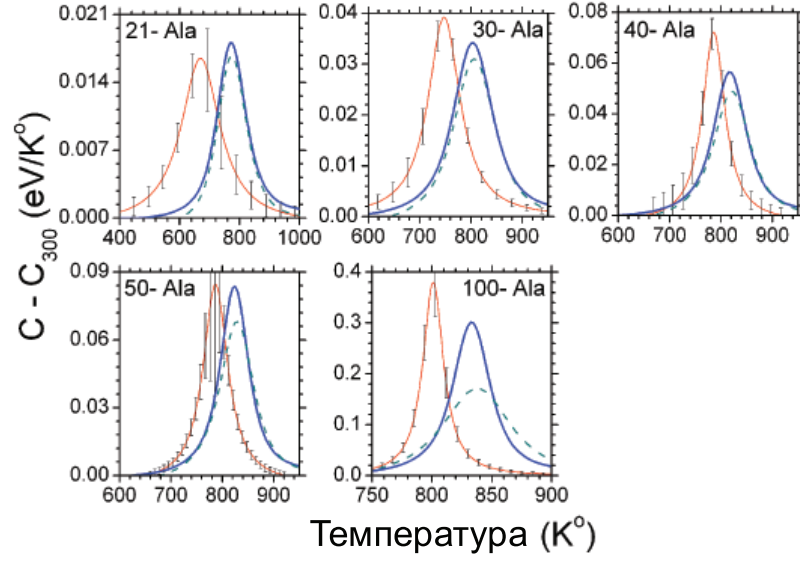


Рис. 4: Зависимости теплоемкости от температуры, рассчитанные для полипептидов аланина, состоящих из 21, 30, 40, 50 и 100 аминокислот. Результаты, полученные с использованием статистического подхода показаны толстой сплошной линией, результаты, полученные на основе молекулярной динамики, показаны тонкой линией. Пунктирной линией показаны результаты, полученные на основе формализма Цимма-Брагга [7].  $C_{300}$  обозначает теплоемкость при 300 K°.

клубок, на случай небольших однодоменных глобулярных белков в водном окружении.

Статистическая сумма белка в водном окружении строится следующим образом:

$$Z = \sum_{j=1}^{\xi} Z_p^{(j)} Z_s^{Y_c(j)} Z_w^{N_t - Y_c(j)}, \quad (7)$$

где  $\xi$  - число возможных конформационных состояний белка,  $Z_p^{(j)}$  - статсумма белка в  $j$ -ой конформации,  $Z_s$  - статистическая сумма молекулы воды, взаимодействующей с поверхностью белка и  $Z_w$  - статистическая сумма молекулы воды, окруженной другими молекулами воды.  $Y_c(j)$  - количество молекул воды, взаимодействующих с поверхностью белка в его  $j$ -ом конформационном состоянии.  $N_t$  - общее количество молекул воды в системе.

Опуская все промежуточные выкладки и допущения о системе, финальное

выражение для статистической суммы белка выглядит следующим образом:

$$Z = (Z_s)^{N_s} \times \left[ Z_u^a Z_s^{N_w} + \sum_{i=a-\kappa}^a \frac{\kappa! \exp(i \cdot E_0/kT)}{(i - (a - \kappa))!(a - i)!} \left( Z_b Z_w^{N_w/a} Z_E^{N_w/a} \right)^i (Z_u Z_s^{N_w/a})^{a-i} \right], \quad (8)$$

где член в квадратных скобках учитывает все статистически-значимые конформационные состояния белка.

Зная статсумму системы, ее свободную энергию  $F(T)$  и теплоемкость  $c(T)$  можно вычислить следующим образом:

$$F(T) = -kT \ln Z(T), \quad (9)$$

$$c(T) = -T \frac{\partial^2 F(T)}{\partial T^2}. \quad (10)$$

В диссертации проанализированы температурные зависимости теплоёмкости двух глобулярных белков: стафилококковой нуклеазы и метмиоглобина, см. Рис. 5.

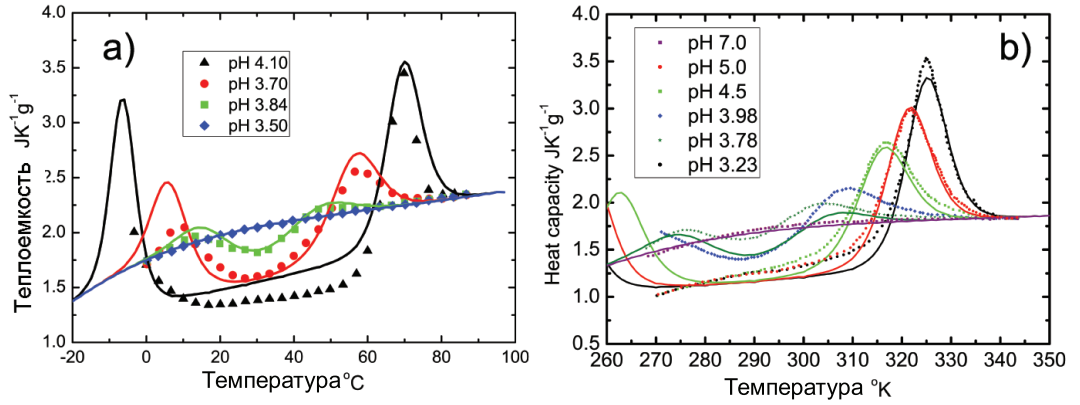


Рис. 5: Зависимость теплоёмкости от температуры метмиоглобина (а, PDB ID 1EYD) и стафилококковой нуклеазы (б, PDB ID 1EYD) при различных значениях pH растворителя. Сплошными линиями показаны результаты теоретической модели. Символами показаны результаты экспериментальных измерений, представленных в [10, 11].

Из рис. 5 видно, что результаты теоретической модели находятся в хорошем согласии с результатами экспериментальных измерений. Действительно, из сравнения теоретических и экспериментальных результатов видно, что разработанная модель хорошо описывает такие особенности сворачивания белков как температуры тепловой и холодной денатурации, характерный температурный диапазон обоих переходов при различных значениях pH раствора, максимальные значения теплоемкости при температуре перехода, уменьшение теплоемкости системы, находящейся в свернутом состоянии, выгнутый профиль



зависимости теплоёмкости от температуры для белка в развернутом состоянии.

В шестой главе “Заключение” обобщены основные результаты работы, приведено заключение и предложены возможные направления дальнейших исследований.

## 2 Публикации автора по теме диссертации

[A1] A. V. Yakubovich, A. V. Solov'yov, W. Greiner, Conformational changes in polypeptides and proteins, International Journal of Quantum Chemistry **110**, 257-269, (2010).

[A2] A. V. Yakubovich, I. A. Solov'yov, A. V. Solov'yov, W. Greiner, Phase transitions in polypeptides: analysis of energy fluctuations, European Physical Journal D **51**, 25-32, (2009).

[A3] A. V. Yakubovich, A. V. Solov'yov, W. Greiner, Statistical mechanics model for protein folding, AIP Conference Proceedings, New York **1197**, 186-200, (2009).

[A4] I. A. Solov'yov, A. V. Yakubovich, A. V. Solov'yov, W. Greiner, Alpha-helix . Coil Phase Transition: Analysis of Ab Initio Theory Predictions, European Physical Journal D **46**, 227-240, (2008).

[A5] A. V. Yakubovich, I. A. Solov'yov, A. V. Solov'yov, W. Greiner, Ab Initio theory of alpha-helix  $\leftrightarrow$  Coil Phase Transition, European Physical Journal D **46**, 215-225, (2008).

[A6] A. V. Yakubovich, I. A. Solov'yov, A. V. Solov'yov, Towards the understanding of structure formation and dynamics in bio-nano systems, Journal of Physics: Conference Series **129**, 012040-(1-9), (2008).

[A7] A. V. Yakubovich, I. A. Solov'yov, A. V. Solov'yov, W. Greiner, On the theory of phase transitions in polypeptides, Imperial College Press, London 241-260, (2008).

[A8] A. V. Yakubovich, I. A. Solov'yov, A. V. Solov'yov, W. Greiner, Nano-scale phase transitions, Europhysics News **38**, 10, (2007).

[A9] А. В. Якубович, И. А. Соловьев, А. В. Соловьев, В. Грайнер, О фрагментации биомолекул: фрагментация дипептида аланина вдоль полипептидной цепи, Журнал Экспериментальной и Теоретической Физики **130**, 534-543 (2006).

[A10] I. A. Solov'yov, A. V. Yakubovich, A. V. Solov'yov, W. Greiner, Ab initio study of alanine polypeptide chain twisting, *Physical Review E* **73**, 021916-(1-10), (2006).

[A11] И. А. Соловьев, А. В. Якубович, А. В. Соловьев, В. Грайнер, Поверхность потенциальной энергии полипептидов аланина, *Журнал Экспериментальной и Теоретической Физики*, **129**, 356-370, (2006).

[A12] A. V. Yakubovich, I. A. Solov'yov, A. V. Solov'yov, W. Greiner, Phase transition in polypeptides: a step towards the understanding of protein folding, *European Physical Journal D* **40**, 363-367, (2006) (Highlight Paper).

[A13] А. В. Якубович, И. А. Соловьев, А. В. Соловьев, В. Грайнер, Конформации полипептидов глицина, *Химическая Физика* **25**, 11-23, (2006).

[A14] A. V. Yakubovich, I. A. Solov'yov, A. V. Solov'yov, W. Greiner, Conformational changes in glycine tri- and hexa- polypeptide, *European Physical Journal D* **39**, 23-34, (2006).

#### Список литературы

- [1] Harber, E. and C. Anfinsen. 1962. Side-chain interactions governing the pairing of half-cystine residues in ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 237:1839–1844.
- [2] Anfinsen, C. and H. Scheraga. 1975. Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Adv. Prot. Chem.* 29:205–300.
- [3] Takagi, T. and T. Isemura. 1962. Studies on the denaturation of taka-amylase a and on its reversibility: 2. urea-denaturation and its reversal by removal or dilution of urea. *J. Biochem.* 52:314–323.
- [4] Go, N. 1983. Theoretical studies of protein folding. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 12:183–210.
- [5] Makhatadze, G. and P. Privalov. 1993. Contribution to hydration to protein folding thermodynamics. i. the enthalpy of hydration. *J. Mol. Biol.* 232:639–659.
- [6] Pain, R., editor. 2000. *Mechanisms of Protein Folding*. Oxford University Press, New York.
- [7] Zimm, B. and J. Bragg. 1959. Theory of the phase transition between helix and random coil in polypeptide chains. *J. Chem. Phys.* 31:526–535.

- [8] Dill, K. A., S. B. Ozkan, M. S. Shell, and T. R. Weikl. 2008. The protein folding problem. *Annu. Rev. Biophys.* 37:289–316.
- [9] Freddolino, P., A. Arkhipov, S. Larson, A. McPherson, and K. Schulten. 2006. Molecular dynamics simulations of the complete satellite tobacco mosaic virus. *Structure.* 14:437–449.
- [10] Privalov, P. 1997. Thermodynamics of protein folding. *Journal Of Chemical Thermodynamics.* 29:447–474.
- [11] Griko, Y., P. Privalov, J. Aturtevant, and S. Venyaminov. 1988. Cold denaturation of staphylococcal nuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:3343–3347.