

## Лекция 10. ФИЗИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ДИНАМИЧЕСКОЙ ПОДВИЖНОСТИ БЕЛКОВ

В предыдущей лекции мы познакомились с характерными временами и амплитудами движений участков белка, которые можно найти экспериментально. Обратим внимание еще раз на то, что полученные величины, конечно, зависят от временного разрешения используемого метода и описывают движение в той микрообласти белка, где локализована соответствующая метка. Для того чтобы на основании этих данных представить себе общую картину и понять законы внутренней динамики белка, необходимо на основе экспериментальных данных составить соответствующие физические модели и проанализировать их свойства. Известно, что малые колебания атомов в твердом теле происходят с высокими частотами  $\omega_0 \sim 10^{13} \text{ c}^{-1}$  ( $\tau \sim 10^{13} \text{ c}$ ) и малыми амплитудами  $x_a \sim 0,01-0,1 \text{ \AA}$ . Эти колебания можно описать как обычные гармонические колебания. Однако такой подход неприменим для описания микродвижений белка с амплитудами  $x_a \gg 0,1 \text{ \AA}$ . Плотность белка очень велика и сравнима с плотностью

жидкостей и органических кристаллов. Поэтому смещение отдельного фрагмента белка на величину, большую чем  $0,1 \text{ \AA}$ , возможно только, если оно одновременно сопровождается образованием флуктуационной полости из-за сдвига других молекулярных групп, окружающих данный фрагмент. Фрагмент белка как бы "расталкивает" соседние группы. Такое движение требует энергии активации для преодоления потенциальных энергетических барьеров, препятствующих смещению фрагмента. Поскольку переход из одного микросостояния в другое сопровождается больши-

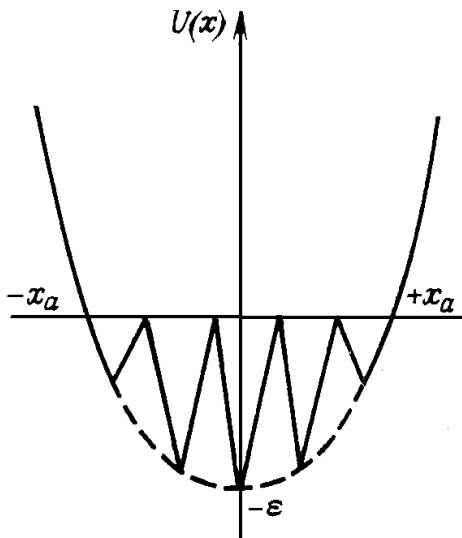


Рис. 10.1. Конформационное движение в вязкой среде (имитация вязкости потенциальной гребенкой)  $x_a$  — средняя амплитуда конформационных флуктуаций;  $U(x)$  — конформационный потенциал;  $\epsilon$  — энергия активации конформационных движений

ми смещениями ( $\sim 1\text{\AA}$ ), то и ширина барьера должна быть довольно большой. Такой процесс перехода нельзя уподобить "одноактному" переходу между двумя микроинформационными состояниями. Переход через широкий барьер здесь представляет собой непрерывный процесс движения в потенциальном поле со сложным рельефом – частой потенциальной гребенкой (рис. 10.1). Таким образом, движение фрагмента белка характеризуется двумя пространственными масштабами. Движение по "частоколу" из частых потенциальных барьеров отражает взаимодействие фрагмента с окружающими белковыми группами. Оно носит диффузионный характер и характеризуется коэффициентом конформационной диффузии  $D(x)$ , зависящим от окружающей среды или от конформационной координаты  $x$ . Другой пространственный масштаб отражает результирующее медленное перемещение вдоль самой конформационной координаты и происходит в конформационном потенциале  $u(x)$ . Как видно из рисунка, выход за пределы конформационной энергетической ямы  $[-x_a, x_a]$  запрещен, так как связанный с остальной белковой молекулой фрагмент не может отойти как угодно далеко. Такое движение в целом соответствует непрерывной ограниченной диффузии в вязкой среде, когда фрагмент испытывает действие случайных толчков или теплового шума. Временная зависимость среднего квадратичного смещения  $[\bar{x}(t)]^2$  в этом процессе определяется формулой

$$[\bar{x}(t)]^2 = \bar{x}_a^2 (1 - e^{-t/\tau_c}). \quad (10.1)$$

Здесь  $\bar{x}_a^2$  – средний квадрат амплитуды смещения,  $\tau_c$  – характерное время релаксации в процессе ограниченной диффузии, зависящее от трения при движении. Оно равно

$$\tau_c = \gamma / m\omega_0^2, \quad (10.2)$$

где  $\gamma$  – коэффициент трения, пропорциональный микровязкости белка,  $m$  – масса фрагмента,  $\omega_0$  – частота колебаний. Напомним, что коэффициент трения зависит от микровязкости белка согласно известной формуле Стокса

$$\gamma = 6\pi b \eta, \quad (10.3)$$

где  $b$  – характерный линейный размер фрагмента ( $b \sim 1 - 10\text{\AA}$ ),  $\eta$  – вязкость в пуазах (пз). Повышение температуры экспоненциально уменьшает вязкость

$$\eta(T) \sim e^{\varepsilon/k_B T} \quad (10.4)$$

( $\varepsilon$  – энергия активации вязкого течения).

Значит, с ростом температуры экспоненциально уменьшается и время  $\tau_c$ , так как

$$\tau_c \frac{\gamma}{m\omega_0^2} = \frac{6\pi b\eta}{m\omega_0^2}, \quad (10.5)$$

$$\tau_2 \sim \eta \sim e^{e/k_b T}.$$

Увеличение вязкости среды приводит к росту  $\tau_c$  т. е. к уменьшению скорости диффузии. Отсюда можно понять влияние температуры на внутримолекулярное движение в белке и, в частности, зависимость среднеквадратичного смещения мессбауэровского атома от температуры (см. рис. 9.5). При низких температурах  $\tau_c$  очень велико, и при поглощении  $\gamma$ -кванта мессбауэровское ядро не успевает сместиться за время пребывания в возбужденном состоянии. В этом случае происходит поглощение  $\gamma$ -кванта без отдачи ( $f' \sim 1$ ). Наоборот, в области высоких температур, где  $\eta$  и  $\tau_c$  малы, ядро успевает сместиться и  $f'$  падает. Таким образом, при повышении температуры в точке излома температурной кривой (см. рис. 9.5) изменяется величина  $\tau_c$ , которая становится ниже критического значения. По температурной зависимости  $f'(T)$  можно найти величины микровязкости  $\eta$  для белков, энергии активации  $\varepsilon$  вязкого течения, амплитуды  $x_a$  конформационных движений. Обработка экспериментальных данных для белков дает обычные значения  $\eta \sim 10^2$  при 300К, что намного больше вязкости воды и глицерина,  $\varepsilon \sim 20$  кДж/моль,  $x_a \sim 0,4\text{\AA}$ . Имеющиеся в структуре белка  $\alpha$ - и  $\beta$ -элементы испытывают ограниченное диффузионное движение, зависящее от жесткости, микровязкости среды. Изгибные флуктуации  $\alpha$ -спиралей имеют определенную форму, причем амплитуда и время релаксации резко зависят от линейных размеров спирали. В реальных условиях амплитуды изгибных флуктуаций могут достигать нескольких ангстрем, а времена релаксации лежат в микросекундном диапазоне.

Таким образом, в белке имеется набор связанных элементов, существенно различающихся по временам релаксации. Наиболее быстрые и мелкомасштабные флуктуации присущи боковым группам. Эти группы образуют жидкоподобную опушку вокруг спиральных участков полипептидного каркаса и играют роль демпфирующей среды. Иерархия во временах релаксаций позволяет представить динамику белковой глобулы как флуктуации в жидкоподобной капле, армированной упругим полипептидным каркасом. Зависимость скорости реакции в белках от вязкости растворителя можно понять на основе этих представлений. Диффузия лигандов внутри глобулы происходит лишь при образовании флуктуационных полостей или "дырок". Появление "дырки" внутри глобулы может быть инициировано образованием ее вначале в растворителе на поверхности глобулы. Вероятность этого процесса обратно пропор-

циона вязкости растворителя. За счет конформационных движений поверхностная группа белка заполняет "дырку" в растворителе. Тем самым "дырка" теперь оказывается уже в наружном слое белка. Далее, за счет движений групп второго и третьих слоев "дырка" диффундирует внутрь глобулы, обеспечивая появление дополнительных флуктуационных полостей. Форма этих полостей в белке, как мы видели, не произвольна, а имеет вид флуктуирующих щелей, параметры которых определяются геометрией жестких элементов белкового каркаса. Решение диффузионных уравнений позволяет вычислить скорость диффузии частиц через систему таких флуктуирующих щелей. Так, при диффузии в миоглобине лиганд CO должен пройти несколько "ворот", которые открываются за счет конформационных движений. Скорость диффузии зависит от диаметра лиганда, амплитуды флуктуации и времени релаксации щели, которая в свою очередь определяется жесткостью и микровязкостью стенок. Для миоглобина расчетные и экспериментальные данные совпали. В частности, оказалось, что общее время прохождения CO в миоглобине составляет  $10^{-7}$  с и соответствует сложению времен конформационных релаксаций нескольких ворот в глобуле. Отметим, что в жесткой молекуле белка, где отсутствуют внутримолекулярные движения и структурные флуктуации, диффузия лиганда должна быть сопряжена с преодолением больших активационных барьеров (до 100 ккал/моль). Эти барьеры настолько замедляют движение лиганда, что оно практически станет бесконечно медленным в масштабах биологического времени. Иными словами, в реальных биополимерах с плотной упаковкой именно структурные флуктуации делают возможным перенос лигандов внутри молекулы, что важно для ее функциональной активности.

Более сложные виды кооперативных релаксационных процессов в белке мы рассмотрим позднее в связи с механизмами ферментативного катализа.

**Численное моделирование динамики белка** – сравнительно новое направление в молекулярной биофизике. В предыдущих лекциях было показано, что конформационная энергия белка определяется атом-атомными взаимодействиями и описывается специальными потенциальными функциями. В результате можно получить энергетические карты, на которых видны усредненные координаты атомов, соответствующие условиям минимума общего конформационного потенциала. Подобную картину дает и метод рентгеноструктурного анализа, с помощью которого определяют среднестатистические положения атомов в белковой структуре. Однако такими способами невозможно проследить за движениями и флуктуациями положения отдельных атомов, которые лежат в основе конформационных флуктуаций и переходов в белках. В методе численного моделирования динамики белка для отдельных атомов непосредственно решаются классические уравнения движения, в которых движущие силы определены из известных потенциальных функций атом-атомных взаимодействий. Исходные координаты тяжелых атомов (не водородных) задаются по рентгеноструктурным данным, причем в на-

чальный момент времени скорости их движения считаются равными в различных, случайно выбранных направлениях. Начальные ускорения движения вычисляются как первые производные сил, действующих на атомы в исходной структуре. Затем, на электронно-вычислительных машинах производится решение системы уравнений движения для всех атомов. Численное решение этих уравнений представляет собой траектории движения отдельных атомов и дает совокупную картину развития структурных флуктуаций во времени. Пока еще удастся проследить за движениями атомов на коротком отрезке времени от  $t = 0$  до  $\sim 200$  пс ( $1 \text{ пс} = 10^{-12} \text{ с}$ ), что обусловлено в основном большим объемом вычислений.

В качестве примера приведем результаты моделирования внутренней динамики белка-ингибитора трипсина (ИТ) панкреатической железы, молекула которого содержит 454 тяжелых атома. Оказалось, что реальные флуктуации положений атомов в белке по отношению к усредненной во времени структуре составляют для  $\alpha$ -углеродных  $0,6 \text{ \AA}$  и  $0,75 \text{ \AA}$  для всех остальных атомов. Наблюдаются также флуктуации в значениях двугранных углов  $\phi$  и  $\psi$  вращения в пептидной цепи в пределах  $10\text{--}20^\circ$  и для угла  $\omega$  в пределах  $7\text{--}9^\circ$ . Эти флуктуации положений быстро затухают в течение  $1\text{--}2$  пс. Однако имеются и долгоживущие, до  $20$  пс, флуктуации в положении  $\alpha$ -углеродных атомов, которые, по-видимому, отражают конформационные переходы в белке. Регулярность флуктуационных движений нарушается тем значительнее, чем чаще атомная группа испытывает столкновения с другими атомами своего микроокружения. В пределах общего широкого конформационного минимума в белке совершаются спонтанные переходы из одного микросостояния в другое за счет тепловой энергии, например, вращение ароматического кольца тирозина в молекуле ИТ. Моделирование на ЭВМ этого процесса показало, что сам переход через потенциальный барьер происходит самопроизвольно, а не за счет сильных активационных соударений с атомами микроокружения кольца. Кольцо тирозина пересекает барьер за время  $\sim 1$  пс по определенной траектории, а толчки микроокружения только стремятся "отвести" кольцо от барьера и "сбить" его с естественной траектории спонтанного перехода. Флуктуации положений отдельных атомов в белке коррелируют друг с другом, что может привести к большому по масштабу структурным сдвигам и конформационным перестройкам. Флуктуационные "дрожания" атомов создают условия и предпосылки для функционально направленных конформационных переходов в белках. Мы еще пока далеки от построения детальной картины динамики белка. Однако уже сейчас можно сделать некоторые общие выводы, основанные на сопоставлении теоретических и экспериментальных результатов по внутримолекулярной подвижности и ее роли в функциональной активности белка. Атомные группы в белке испытывают на себе действие различных сил (кулоновские, ван-дер-ваальсовы взаимодействия), а также случайных "тепловых" толчков со стороны соседних групп. Кроме того, они могут участвовать и в нормальных ко-

лебаниях, когда небольшие смещения атомов от положения равновесия несут гармонический характер. Наблюдаются также сравнительно редкие "прыжки" с преодолением активационных барьеров. Вообще говоря, каждая атомная группа может участвовать в различных движениях, так что общее смещение атома зависит сложным образом от вкладов различных сил. В большинстве белков амплитуда флуктуаций растет при удалении от центра к периферии молекулы. Для атомов основной цепи среднеквадратичные смещения составляют 20,4 Å, а для атомов на длинных боковых цепях – около 1,5 Å. Элементы вторичной структуры ( $\alpha$  и  $\beta$ ), имеющие водородные связи, характеризуются меньшими флуктуациями, чем другие, "неорганизованные", части белка. Широкие вариации амплитуд флуктуаций указывают на гетерогенность белка и наличие участков, различающихся по подвижности и гибкости. В отличие от остатков, находящихся внутри молекулы белка, движение боковых цепей, особенно содержащих заряженные группы, подвержено сильному влиянию окружающей среды (растворителя). Само по себе движение атомов носит анизотропный характер, когда случайные флуктуации сильно отличаются по амплитудам в зависимости от направления смещения (иногда в 2 раза). Направление наибольшего смещения атома определяется особенностями крупномасштабных коллективных взаимодействий этого атома и соседних групп. Такие кооперативные движения происходят за долгое время  $\geq 10$  пс по сравнению с локальными смещениями ( $\sim 0,2$  пс). Корреляция мелких флуктуационных смещений приводит к появлению кооперативных крупномасштабных движений, включающих большое число атомов. Мелкие смещения играют еще роль "смазки", облегчающей крупномасштабные смещения, когда происходит вовлечение белковых доменов уже за более длинные ("физиологические") времена. Именно коллективные движения важны в процессе функционирования белка, при котором происходят направленные смещения его структурных элементов, необходимые для достижения активной конформации.