

На правах рукописи



Кошлан Татьяна Викторовна

**УЧЕТ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ ПРОГНОЗИРОВАНИИ
СТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ:
ТЕОРИЯ И РАСЧЕТ ДЛЯ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ**

Специальность 03.01.02 – биофизика

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург — 2019

Работа выполнена на кафедре «Медицинская физика» в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО «СПбПУ»)

Научный руководитель: **Куликов Кирилл Геннадьевич**
доктор физико-математических наук, профессор
Высшая школа биомедицинских систем и технологий
ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого»

Официальные оппоненты: **Попов Игорь Юрьевич**
доктор физико-математических наук, профессор
факультета систем управления и робототехники
ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский
университет информационных технологий, механики и оптики»

Вяткина Кира Вадимовна
кандидат физико-математических наук
заведующий кафедрой «Биоинформатика и математическая биология»
СПБАУ РАН «Академический университет»

Ведущая организация: ФГБУН «Институт цитологии РАН»

Защита состоится «13» декабря 2019 года в 14:00 на заседании диссертационного совета Д212.229.25 при Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО «СПбПУ») по адресу: 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина 11, корп.1, Высшая школа биомедицинских систем и технологий.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» по адресу: 195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., д. 29, а также на сайте ФГАОУ ВО «СПбПУ»:
<http://www.spbstu.ru>.

Автореферат разослан «___» 2019 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.229.25,
доктор технических наук, доцент

Тимофеев Андрей Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность задачи.

Белковые молекулы - один из важнейших видов макромолекул живой природы. Они выполняют множество функций: ферментативную (катализитическую), структурную, сократительную и др.

Каждая белковая молекула характеризуется своей нативной конформацией, которая определяется аминокислотной последовательностью, и пребывание в которой позволяет ей выполнять свои биологические функции.

Взаимодействие между такими белковыми молекулами осуществляется в определенных участках, строение которых определяется их конформацией. Определение таких активных участков, ответственных за связывание белковых комплексов на данный момент является сложной задачей, поскольку далеко не всегда известна даже точная конформация белков. По этой причине определить афинность и сродство различных участков белков, их реакционную способность и устойчивость образованного биологического комплекса, а также вероятность участия различных доменов в образовании биологического комплекса, является весьма сложной задачей для экспериментатора.

Для исследования и определения структуры белка и уточнении его свойств используется метод молекулярной динамики, который изначально был разработан в теоретической физике, получил большое распространение в химии и, начиная с 1970-х годов, в биохимии и биофизике. Одной из важных задач в протеомике является исследование белковых взаимодействий, поскольку участие белков в различных химических процессах и в передаче сигнала определяют функционирование клетки и всего организма в целом. Также практически невозможно учесть подвижность аминокислотных остатков и полипептидных цепей белка-мишени при взаимодействии с низкомолекулярным лигандом, поскольку это приводит к так называемому «комбинаторному взрыву», что в свою очередь не позволяет говорить о единственности найденного варианта взаимодействия белка-мишени с лигандом. Так в работе [1] в ходе выполненного моделирования методами молекулярной динамики, были найдены от 200 до 10 000 возможных комбинаций образования комплекса белка с лигандом. Такое огромное количество модификаций наряду с отсутствием критерия отбора наиболее вероятных вариантов связанных структур биологических комплексов (который бы позволял радикально сократить их количество), делает весьма затруднительным интерпретацию полученных теоретических результатов для практического применения, а именно: нахождение каталитических центров и качественная оценка константы диссоциации взаимодействующих веществ.

Разработанный и физически обоснованный в диссертации математический подход в дополнение к работам по молекулярной динамике, позволит изучать поведения димеров *in vitro*, изучать влияние фосфорилирования аминокислотных остатков полипептидной цепи на образование биологических комплексов, определять нахождение активных участков белков и выявлять стабильность различных участков белковых комплексов путем анализа матрицы потенциальной энергии электростатического взаимодействия между различными участками полипептидных цепей участвующих белков, а также исследовать влияние точечных замен в ВНЗ-пептидах на стабильность образованного ими биологического комплекса с проапоптическими белками семейства Bcl-2 и качественно определять K_d при связывании различных ВНЗ-пептидов с белками семейства Bcl-2.

В перспективе это позволит решать фундаментальные и прикладные проблемы медицины, например, разрабатывать новые лекарственные средства, изучать процессы происходя-

щие при развитии болезней, что являются **актуальной задачей**.

Цель диссертационной работы. Целью диссертационной работы является разработка биофизических подходов для исследования стабильности белковых комплексов с использованием методов вычислительной линейной алгебры, электростатики и компьютерного моделирования.

Научная новизна работы.

1. Построена математическая модель взаимодействия белковых молекул, на примере белков гистонового шаперона Nap1. Разработанная модель позволяет сделать вывод о взаимодействии между различными аминокислотными последовательностями на основании предложенного и физически обоснованного в диссертации критерия (числа обусловленности матрицы, элементами которой являются потенциальные энергии электростатического взаимодействия между попарно взятыми аминокислотными остатками белков) и определять какие из приведенных биологических объектов образуют более устойчивые соединения. Разработанный подход позволит определить наиболее устойчивые сайты взаимодействия между белками, если есть предварительные данные о трехмерной структуре белков. Предложенные методы помогут внести ясность и однозначность в результаты полученных экспериментальных работ, поскольку будут выявлены наиболее устойчивые области взаимодействия.

2. Введенный критерий (число обусловленности матрицы, элементами которой являются потенциальные энергии электростатического взаимодействия между попарно взятыми аминокислотными остатками белков) позволит прогнозировать уменьшение и увеличение силы связывания белков при образовании димерных комплексов.

3. Разработана математическая модель фосфорилирования аминокислотных остатков полипептидной цепи белка p53, проведен численный расчет матриц потенциальной энергии электростатического взаимодействия различных аминокислотных последовательностей с учетом фосфорилирования двух аминокислотных остатков белка p53 и выполнен анализ влияния фосфорилирования полипептидных последовательностей данного белка на его реакционную способность образовывать биологические комплексы с различными участками белков p300 и Mdm2. В ходе выполненного анализа было выявлено, что фосфорилирование двух аминокислотных остатков Thr 18 и Ser 20 N-конца белка p53 приводит к изменению стабильности биологических комплексов, образованных различными доменами белков p53, p300 и Mdm2.

Полученные результаты выявили влияния процессов фосфорилирования N-конца белка p53 на устойчивость биологических комплексов, образованных участками белков p53–p300 и p53–Mdm2.

Таким образом, возможно определить механизм переключения биологической активности такого важного белка, как p53, который является супрессором опухолей и играет важную роль во многих клеточных процессах.

4. Разработаны математические алгоритмы, которые позволяют определять нахождение активных участков белков, которые представлены подряд расположеными аминокислотными остатками в полипептидной цепи белка и определять их стабильность, таких как гомодимер гистонового шаперона Nap1–Nap1 и гомодимера Mdm2–Mdm2. Таким образом, разработанная математическая модель позволит проводить анализ различных биологических комплексов, что поможет определить в будущем направление каскадных биохимических реакций.

В перспективе это позволит определять активные участки связывания полипептидных це-

пей различных белков, а также подобрать и синтезировать высокоселективные полипептидные последовательности, которые будут связываться в заданном исследователем активном центре белка, что будет приводить к его активированию или ингибированию и блокировке дальнейшей передачи сигнала в живую клетку.

5. Разработан математический алгоритм для определения влияния точечных замен аминокислотных остатков на сродство между белковыми молекулами, активный центр которых «рассеян» по полипептидной цепи белка.

В ходе выполненного численного моделирования получается набор решений, контроль однозначности которого осуществляется путем качественного сопоставления полученных численных значений логарифма числа обусловленности матрицы, элементами которой являются потенциальные энергии электростатического взаимодействия между попарно взятыми аминокислотными остатками белков и изменение энтропии, с константой диссоциации (K_d).

Предложенный подход дает возможным находить оптимальные пептиды с учетом сродства к их белкам-мишеням и разрабатывать в будущем ингибиторы или активаторы белков.

Практическая ценность результатов работы.

1. Разработанные в диссертации математические модели позволяют:

- синтезировать аминокислотные последовательности с определенными физическими характеристиками,
- ускорить и повысить эффективность проводимых экспериментов, а так же снизить их стоимость за счет уменьшения количества проводимых опытов,
- создавать модели пептидов с заданными реакционными свойствами.

2. Реализованные математические модели, выполненные диссертантом, реализованы в виде оригинального программного комплекса и были апробированы в численных экспериментах. Это позволило в автоматическом режиме варьировать состав биологических субстанций, их физические и геометрические параметры с целью регистрации зависимостей между ними, что дает в будущем использовать разработанный программный комплекс в качестве инструмента исследования в области молекулярной биофизики.

Таким образом, мы можем прогнозировать устойчивость белковых комплексов, качественно определять константу диссоциации, синтезировать пептиды с заданной константой диссоциации к различным белкам, при этом позволяя увеличивать избирательность пептидов, увеличивая сродство к одним белкам и уменьшая к другим, что является важным условием усовершенствования пептидной терапии.

Достоверность результатов основывается:

1. на надежности и теоретической разработанности математических методов, корректностью используемых приближений, воспроизводимостью расчетных данных;
2. на сравнении теоретических результатов построенных моделей с данными, полученными экспериментальным путем другими авторами.

Характер результатов. Совокупность полученных в диссертации результатов позволяет считать, что в ней представлено решение научной задачи, имеющей важное значение для развития молекулярной биофизики, в том числе биофизики белковых комплексов. На основе результатов теоретического исследования, проведенного в диссертационной работе, основанного на анализе электростатического взаимодействия между белковыми молекулами, предложен новый способ, позволяющий исследовать физические свойства биологических структур и использовать полученные результаты биофизических исследованиях и в биомедицинских исследованиях.

Положения, выносимые на защиту.

1. Число обусловленности матрицы, элементами которой являются потенциальные энергии электростатического взаимодействия между попарно взятыми аминокислотными остатками биологических комплексов для различных доменов белков, служит критерием стабильности, образовавшегося биологического комплекса, а также позволяет исследовать процессы фосфорилирования на примере димеров типа p53–Mdm2 и p53–p300.

2. Разработанные в диссертации алгоритмы позволяют определять нахождение каталитически активных участков белковых молекул при взаимодействии без учета трехмерной структуры при условии что активный участок взаимодействия состоит из подряд расположенных аминокислотных остатков полипептидной цепи: белок-белок, пептид-белок, пептид-пептид, домен-домен, а также выявлять стабильность различных участков белковых комплексов (линейный докинг) путем анализа матрицы потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия между различными сайтами биологического комплекса, таких как гомодимер гистонового шаперона Nap1–Nap1 и гомодимер Mdm2–Mdm2, которые отвечают за вступление целой белковой молекулы в биохимические реакции.

3. Математический метод, основанный на анализе матрицы, элементами которой являются потенциальные энергии электростатического взаимодействия между попарно взятыми аминокислотными остатками исследуемых биологических комплексов, позволяет с учетом трехмерной структуры:

- учитывать влияние точечных замен аминокислотных остатков в пептидах при связывании с целыми белками,
- качественно определять диапазон изменения аффинности при связывании целого белка с различными пептидами.

Личный вклад автора. Все результаты работы получены автором лично или при его определяющем участии.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на семинаре кафедры физической электроники и кафедры медицинской физики Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, в лаборатории регуляции экспрессии генов ФГБУН Института цитологии РАН, на международных конференций EMBO Conference: Molecular Machines: Integrative Structural and Molecular Biology, 2016, 20-23 November, Heidelberg, Germany и Proteomic Forum, 2017, 2-5 April, Potsdam, Germany, 10th International Congress on Structural Biology, October 18-19, 2018 Helsinki, Finland, Proteomic Forum, 2019, 24-28 March, Potsdam, Germany.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, в числе которых 6 статей в изданиях, рекомендованных ВАК и индексируемых в БД Scopus и Web of Science и одна монография, изданная издательством Springer-Nature.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из 5 глав, введения, заключения. Содержит 101 страницу машинописного текста, включая 52 рисунка, 7 таблиц и список используемых источников, насчитывающий 85 наименований.

Во **введении** сформулированы актуальность темы, обоснование выбора объекта исследования, цели, основные результаты, научная новизна, практическая ценность, положения выносимые на защиту и структура диссертации.

Во **введении** сформулированы актуальность темы, обоснование выбора объекта исследования, цели, научная новизна, практическая ценность, характер результатов, положения

выносимые на защиту, структура и объем диссертации.

Первая глава. Первая глава посвящена обзору и критическому анализу различных экспериментальных подходов, связанных с исследованием структуры молекул, взаимного расположения доменов в пространстве, выявления активных центров белков, в частности методы электрофореза, методы хроматографического анализа, масс-спектрометрия, рентгеноструктурный анализ кристаллов белков, методы спектрального анализа, круговой диахроизм. Отмечено, что большинство приведенных экспериментальных подходов имеют существенные ограничения в области исследования различных физических свойств биологических комплексов.

Вторая глава посвящена разработке математической модели электростатического взаимодействия между аминокислотными последовательностями различных белков, а также сформулированы математические основы, которые позволяют теоретически определять устойчивое состояние биологического комплекса.

Глава состоит из нескольких частей. Первая часть посвящена построению физической модели электростатического взаимодействия между аминокислотными последовательностями различных белков. Во второй части сформулирована и доказана теорема, которая определяет критерий устойчивости белковых молекул с определенной структурой. В заключении приведены основные выводы.

В рассматриваемой физической модели каждая аминокислота представлена в виде равномерно заряженной сферы со своим зарядом и значением радиуса. Белок представлен, как свободно-сочлененная полиаминокислотная последовательность [2].

При исследовании взаимодействия заряженных белковых молекул использовался ряд приближений:

1. энергия взаимодействия белков определяется только силами электростатического взаимодействия [3] ;
2. белковая молекула моделируется как соединенные между собой аминокислотные остатки, имеющие шарообразную форму со своим радиусом;
3. каждый аминокислотный остаток белка представляется как равномерно заряженная сфера.

Размер радиуса сферы каждого аминокислотного остатка был взят из работы [4].

При рассмотрении задачи электростатического взаимодействия между белками 20 аминокислотными остатков разделены на 5 классов с зарядами от $0.15e$ до $1e$ согласно [5].

Первому классу присвоены одноименные заряды по $0.15e$ каждый.

Второму классу—одноименные заряды по $0.25e$ каждый. Третьему классу—разноименные заряды - $0.45e$ и $+0.45e$ каждый, а четвертому классу—разноименные заряды $-0.65e$ и $+0.65e$ каждый. Пятому классу были присвоены разноименные заряды $-1e$ и $+1e$ каждый, где e —заряд электрона. Отметим, что квадрат модуля волновой функции, которая описывает состояние электрона в многоцентровой модели и определяет плотность вероятности нахождения электрона или плотность электронного облака, которая характеризует неодинаковую вероятность нахождения электрона в выбранной части объема электронного облака в многоатомном аминокислотном остатке. Отсюда следует, что перераспределение электронных зарядов в многоатомных аминокислотных остатках вполне может приводить к тому, что вероятность нахождения валентного электрона в окрестности остатка окажется меньше единицы, а среднее значение заряда остатка- меньше чем заряд электрона.

Расстояния между двумя взаимодействующими аминокислотными остатками соседних

белков были взяты из [5], [6]–[7].

Далее решается задача попарного электростатического взаимодействия для двух проводящих сфер, моделирующих аминокислотные остатки (см. рис. 1) и находятся соответствующие значения потенциальной энергии электростатического взаимодействия между аминокислотными остатками, которые записываются в матрицу (см. рис.2).

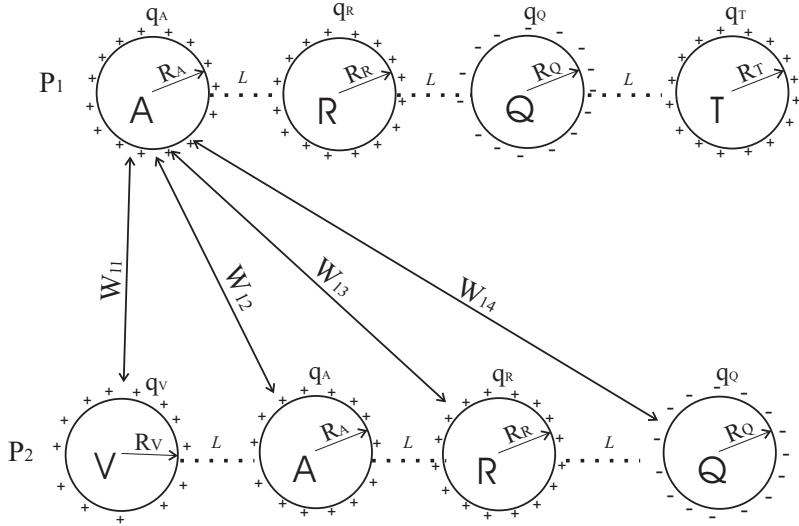


Рис. 1: Схема взаимодействия аминокислотных остатков двух взаимодействующих белков P_1 и P_2 . Каждая аминокислота моделируется равномерно заряженной сферой заданного диаметра.

	A	R	Q	T
V	W_{11}	W_{12}	W_{13}	W_{14}
A	W_{21}	W_{22}	W_{23}	W_{24}
R	W_{31}	W_{32}	W_{33}	W_{34}
Q	W_{41}	W_{42}	W_{43}	W_{44}

Рис. 2: Представление матрицы потенциальной энергии электростатического взаимодействия $W_{i,j}, i = \overline{1,4}, j = \overline{1,4}$ двух белков P_1 и P_2 .

Для анализа биохимических процессов вводится понятие числа обусловленности $\text{cond}(W_0)$ матрицы W_0 :

$$\text{cond}(W_0) = \frac{\sigma_{\max}(W_0)}{\sigma_{\min}(W_0)}, \quad (1)$$

где $W_0 = (W_{ij})$ – матрица потенциальной энергии электростатического взаимодействия между попарно взятыми аминокислотными остатками биологического комплекса (см. рис.2), $\sigma_{\max}(W_0)$, $\sigma_{\min}(W_0)$ – наибольшие и наименьшие сингулярные числа матрицы W_0 .

Далее сформулирована и доказана теорема, которая определяет критерий устойчивости белковых молекул с определенной структурой.

Теорема. Критерием устойчивости белковых молекул определенной структуры является число обусловленности матрицы, элементы которой определяются через потенциальные

энергии электростатического взаимодействия между попарно взятыми аминокислотными остатками биологических комплексов для различных структур.

При этом для выбора более устойчивого биохимического соединения между белками мы выбираем матрицу потенциальной энергии электростатического взаимодействия с **наименьшим** значением числа обусловленности.

В третьей главе разработана физическая модель влияния фосфорилирования аминокислотных остатков полипептидной цепи на образование биологических комплексов на примере фосфорилирования гибкого N-конца белка p53 по двум аминокислотным остаткам и анализ стабильности образованных им биологических комплексов p53–Mdm2 и p53–p300 до и после фосфорилирования. Отметим, что в данной главе исследовалось взаимодействие гибкого слабоупорядоченного N–конца белка p53 с N–концом белка Mdm2 и доменом Taz2 белка p300 с учетом эффектов фосфорилирования. Несмотря на то, что N–конец белка Mdm2 и домен Taz2 белка p300 имеют упорядоченную трехмерную сложную структуру, гибкий N–конец белка p53 может принимать различные конформации, что позволяет ему связываться с большим количеством доменов разнообразных белков, а фосфорилирования аминокислотных остатков белка p53 приводит к изменению аффинности выбранного участка N–конца к белкам p300 и Mdm2, что в свою очередь имеет большое значение для различных биологических клеточных процессов, таких как репарация ДНК, остановка клеточного цикла, апоптоз клетки.

Для учета эффекта фосфорилирования были сделаны следующие предположения:

- аминокислотные остатки серина 20 и треонина 18 белка p53 представлены в виде сфер со своими радиусами и зарядами,
- выбранные аминокислотные остатки серина (S) и треонина (T) были заменены на отрицательно заряженные остатки фосфорной кислоты OPO_3H_2 , которые также представлены в виде сфер с радиусом равным $0.3 \cdot 10^{-9}\text{м}$,
- остатки фосфорной кислоты (PP) взаимодействуют с пятью заряженными аминокислотными остатками (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, гистидин, лизин) и обладают зарядом равным $-1.6 \cdot 10^{-19}\text{Кл}$,
- остатки фосфорной кислоты (PP) взаимодействуют с гидрофобными аминокислотными остатками аспарагина (N), метионина (M), лейцина (L), тирозина (Y), валина (V), которые имеют существенную роль в образовании биологического комплекса с участием N-конца белка p53, с зарядом $0.4 \cdot 10^{-19}\text{Кл}$.

Для расчета были выбраны как целые последовательности белков p53 и Mdm2, так и отдельные участки этих белков: $\text{p53}_{(1-70)}$, $\text{Mdm2}_{(50-104)}$, $\text{Mdm2}_{(25-104)}$. Вторая часть посвящена численным расчетам образования биологических комплексов различными участками белков p53 и p300. В заключении приведены основные выводы.

Выполненное численное моделирование устойчивости образованных биологических комплексов при участии различных участков белков p300, p53 и Mdm2 при фосфорилировании N-конца белка p53 находится в хорошем согласии с [8]–[10].

В четвертой главе разработаны математические алгоритмы, которые позволяют определять нахождение активных участков белков и выявлять стабильность различных участков белковых комплексов (линейный докинг) путем анализа матрицы потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия между различными сайтами биологического комплекса, таких как гомодимер гистонового шаперона Nap1–Nap1, гетеродимер белков p53–Mdm2 и гомодимер Mdm2–Mdm2, которые отвечают за вступление целой белковой мо-

	D	T	E	V	N	K	L
	A	D	H	V	N	R	T
$P_{11} =$	D	T	E	V	N	K	L
$P_{21} =$	A	D	H	V	N	R	T
$P_{12} =$	D	T	E	V	N	K	L
$P_{22} =$	D	H	V	N	R	T	Y
$P_{13} =$	D	T	E	V	N	K	L
$P_{23} =$	H	V	N	R	T	Y	O
$P_{14} =$	D	T	E	V	N	K	L
$P_{24} =$	V	N	R	T	Y	O	I
$P_{15} =$	D	T	E	V	N	K	L
$P_{25} =$	N	R	T	Y	O	I	K

Рис. 3: Схема алгоритма №1 для поиска активных взаимодействующих участков.

лекулы в биохимические реакции.

Глава состоит из нескольких частей. В первой части дано описание разработанных алгоритмов.

Первый алгоритм разработан для поиска участков белка, отвечающих за белковые взаимодействия. При его разработке были сделаны следующие предположения:

- участок взаимодействия двух белков имеет много близкорасположенных взаимодействующих аминокислотных остатков, например, как в случае образования гомодимеров Nap1–Nap1, Mdm2–Mdm2, p53–Mdm2.

- расчет делается в предположении, что мы имеем сведения о структуре белка, который может отвечать за белковые взаимодействия и играть важную роль в образовании гомо-или гетеродимеров.

В данном алгоритме (см. рис. 3) представлены два одномерных массива:

- массив 1 «DTEVNKL» и массив 2 «ADHVNRTYOOIK», которые являются аминокислотными последовательностями белков P_1 и P_2 , соответственно. Массив белка P_1 имеет меньшее количество аминокислотных остатков в своей полипептидной последовательности, чем белок P_2 и представляет собой вырезанный, предположительно, активный участок белка P_1 . Более короткая аминокислотная последовательность одномерного массива P_1 сдвигается вдоль более длинной аминокислотной последовательности одномерного массива белка P_2 с некоторым шагом, в нашем примере шаг равен одному аминокислотному остатку. При каждом таком шаге происходит образование короткого отрезка из аминокислотной последовательности белка P_2 , равного длине более короткого одномерного массива белка P_1 . Каждый новый отрезок массива P_2 соответствует по длине полипептидной цепи P_1 .

Второй алгоритм разработан для обнаружения взаимодействующих участков белковых

молекул. Схема поиска взаимодействующих участков приведена на рис. 4.

В данном алгоритме взяты целые аминокислотные последовательности двух белков P_1 и P_2 . Для выбора взаимодействующих участков мы сдвигаем рамку заданного размера вдоль двух одномерных массивов белков P_1 и P_2 . Данным методом проверялись взаимодействующие участки для следующих пар белков: Nap1–Nap1, Mdm2–Mdm2. Найдя все взаимодействующие пары одномерных массивов, построим матрицы потенциального электростатического взаимодействия между их аминокислотными остатками. Эти матрицы будут иметь квадратную форму. Далее для каждой из этих матриц вычислено значение $\lg(\text{cond}(W))$ и построен график зависимости $\lg(\text{cond}(W))$ в зависимости от порядкового номера аминокислотного остатка одномерного массива P_2 , где $(\text{cond}(W))$ – число обусловленности. Для обработки полученных предположено, что за наиболее устойчивое положение взаимодействующих участков отвечает наименьшее значение $\lg(\text{cond}(W))$.

Вторая часть посвящена численным расчетам. В заключении приведены основные выводы.

Полученные в ходе численного моделирования участки взаимодействия различных белков, таких как, Nap1, Mdm2, находятся в хорошем согласии с найденными ранее участками в экспериментальных работах [10]–[12].

Пятая глава посвящена исследованию взаимодействия BH3-пептидов с анти-апоптозными белками семейства Bcl-2, которые являются регуляторами путей митохондриального апоптоза. Отметим, что нарушения в процессе апоптоза является признаком большого количества заболевания, таких как рак, саркомы, карциномы, лимфомы, лейкозы.

В данной главе предлагается математическая модель определения сродства различных BH3-пептидов к белкам семейства Bcl-2, а так же учет влияния точечных мутаций в пептидах на устойчивость сформированного ими биологического комплекса.

Глава состоит из нескольких частей. Первая часть главы содержит информацию о структуре и функциях исследуемых белков семейства Bcl-2. Вторая часть посвящена численному расчету взаимодействия пептидов белков семейства Bcl-2, содержащих BH3-участок, с белком Bcl-2. В данной части проведен анализ и обработка полученных численных расчетов и проведено качественное сравнение полученных расчетов с константой диссоциации (K_d), а также исследовано влияние точечных замен в BH3-пептидах белка Bax на стабильность образованных ими биологических комплексов с белком Bcl-2. Анализ полученных численных результатов находится в хорошем согласии с [13]. Также был представлен новый метод, который позволяет анализировать потенциальную энергию электростатического взаимодействия белковых комплексов при точечных заменах аминокислотных остатков с учетом трехмерной структуры комплекса на примере образования димера Nap1–Nap1. Были разработаны карты потенциальной энергии электростатического взаимодействия попарно взятых аминокислотных остатков взаимодействующих белков. Проведен анализ взаимодействующих белков с учетом трехмерной структуры.

В заключении приведены основные выводы.

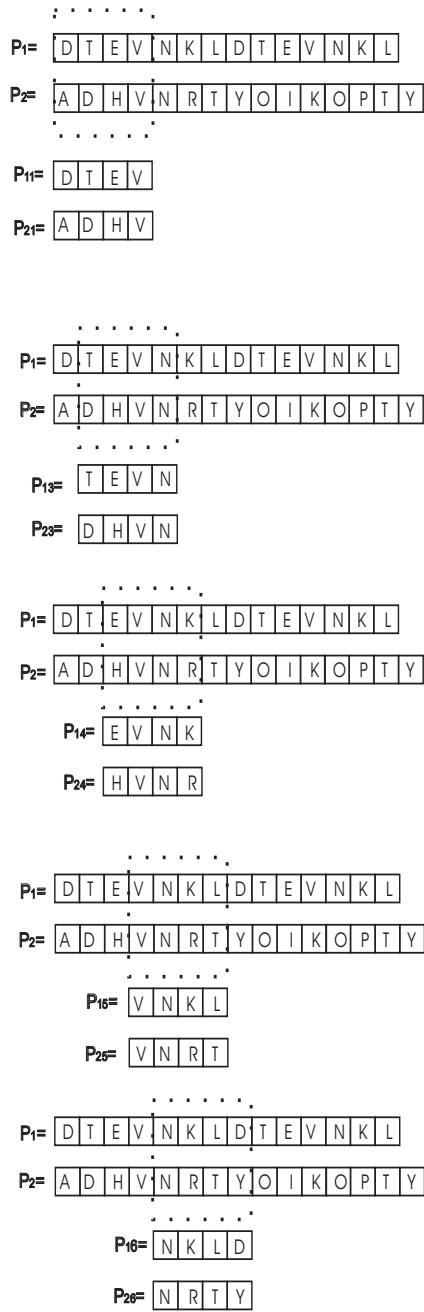


Рис. 4: Схема алгоритма №2 для поиска активных взаимодействующих участков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты диссертации сводятся к следующему:

1. Разработана математическая модель фосфорилирования аминокислотных остатков полипептидной цепи белка p53 и выполнен анализ влияния фосфорилирования полипептидных последовательностей данного белка на его реакционную способность образовывать биологические комплексы с различными участками белков p300 и Mdm2. В ходе анализа выявлено, что фосфорилирование двух аминокислотных остатков Thr 18 и Ser 20 N-конца белка p53 приводит к изменению стабильности биологических комплексов, образованных различными доменами белков p53, p300 и Mdm2.

Результаты, полученные в этой главе выявили влияние процессов фосфорилирования N-конца белка p53 на устойчивость биологических комплексов, образованных участками белков p53-p300 и p53-Mdm2

Так, фосфорилирование N-конца участков белка $p53_{(1-57)}$ и $p53_{(1-70)}$ приводит к уменьшению стабильности образованного им комплекса с участками белка $Mdm2_{(1-104)}$ и $Mdm2_{(25-104)}$ и увеличение стабильности комплекса p53-p300, образованного участками белка $p53_{(1-57)}$ и $p53_{(1-70)}$, а также участком белка $p300_{(1726-1806)}$.

Отметим, что образование комплекса p53–Mdm2 ведет к деградации белка p53. При поступлении сигналов о нарушении целостности ДНК происходит фосфорилирование белка p53 и разрушение комплекса p53–Mdm2, и как следствие, высвобождение белка p53, который может образовывать комплексы с белком p300, который способствует стабилизации и трансактивации функции p53 в ответ на повреждение ДНК. Таким образом, выявлен механизм переключения биологической активности такого важного белка, как p53, который является супрессором опухолей и играет важную роль во многих клеточных процессах.

2. Разработанные математические алгоритмы (алгоритм №1 и №2) позволяют определять нахождение активных участков белков и выявлять стабильность образованного биологического комплекса таких как гомодимер гистонового шаперона Nap1–Nap1 и гомодимера Mdm2–Mdm2.

Результаты расчетов, выполненные для белка Nap1 при взаимодействии с другим белком Nap1 и последующим образованием гомодимера Nap1–Nap1 согласно алгоритму 1 и алгоритму 2 продемонстрировали практически идентичные найденные полипептидные последовательности с помощью двух данных алгоритмов.

Так с помощью алгоритма 1 было выявлено минимальное значение величины $\lg(\text{cond}(W))$ при взаимодействии аминокислотных последовательностей Nap1₍₈₁₋₁₄₀₎–Nap1₍₁₃₄₋₁₉₃₎, при этом последовательность Nap1₍₈₁₋₁₄₀₎ была задана изначально, а последовательность Nap1₍₁₃₄₋₁₉₃₎ была найдена в ходе численного моделирования.

При выполнении численного расчета согласно алгоритму 2 был выявлен кластер минимальных значений величины $\lg(\text{cond}(W))$ в области полипептидной последовательности белка Nap1 с 88 а.а. по 161 а.а. Таким образом, найденные аминокислотные последовательности в ходе численного расчета, согласно алгоритмам 1 и 2, являются участками домена I, который, как было выявлено ранее, ответственен за образование гомодимера.

Результаты, полученные в ходе выполненного численного моделирования для белка Mdm2 при его гомодимеризации Mdm2–Mdm2 согласно алгоритму 1, позволил установить участок Mdm2₍₄₂₅₋₄₈₉₎, который является участком домена Ring и как было выявлено ранее играет существенную роль в образовании гомодимера Mdm2–Mdm2 [11].

Для поиска новых участков связывания полипептидов в димеры необходимо проводить более масштабные вычислительные исследования по поиску активных участков связывания биологических молекул. При этом рекомендуется использовать примерно одинаковые длины коротких одномерных массивов вектора P_1 для случая алгоритма 1, а также одинаковые размеры рамки сдвига при использовании алгоритма 2 для последующего корректного сравнения полученных результатов между собой.

В перспективе это позволит определять активные участки связывания полипептидных цепей различных белков, а также подобрать и синтезировать высокоселективные пептиды, которые будут связываться в активном центре белка и приводить к его активированию или ингибированию и блокировке его биологических функций.

6. Разработан новый метод, который позволяет анализировать активные участки взаимодействия белковых молекул «рассеянных» по полипептидной цепи белка.

Применение разработанного метода позволит находить оптимальные пептиды с учетом сродства к их мишениям и разрабатывать в будущем ингибиторы или активаторы белков-мишеней.

В результате выполненных численных расчетов на основе построенной модели были получены следующие результаты:

6.1. Определение устойчивости белковых комплексов при точечных заменах аминокислотных остатков с учетом трехмерной структуры биокомплекса, на основе введенного критерия: число обусловленности попарного потенциальной энергии электростатического взаимодействия аминокислотных остатков.

6.2. Разработаны карты потенциальной энергии электростатического взаимодействия попарно взятых аминокислотных остатков участвующих белков, которые позволяют наглядно увидеть характер образования белкового комплекса, идентифицировать максимумы и минимумы потенциальной энергии между аминокислотными остатками двух белков, определять ключевые аминокислотные остатки, на которые приходятся максимальные значения потенциальной энергии. Особое внимание уделено природе взаимодействующих аминокислотных остатков (гидрофобные, гидрофильные, заряженные). Проведен анализ взаимодействующих белков с учетом трехмерной структуры, где были обозначены участки с наибольшим значением потенциальной энергии электростатического взаимодействия.

6.3. В предположении того, что при помещении аминокислотного остатка в гидрофобный карман, состоящий из других аминокислотных остатков, внутри кармана с большей вероятностью останется тот аминокислотный остаток, у которого изменение энтропии (ΔH , где H – энтропия), а также разница между среднеквадратическим отклонением ($\Delta\sqrt{D}$, где D – дисперсия) для данной замены аминокислотного остатка и среднеквадратическим отклонением аминокислотного остатка белка дикого типа в гидрофобном кармане будут минимальны.

Следует отметить, что $\Delta\sqrt{D}$ и ΔH коррелирует с $\lg(\text{cond}(W))$, который в данной постановке задачи характеризует устойчивость биологического комплекса.

6.4. Полученные теоретические результаты находятся в хорошем согласии с проведенными экспериментами по выявлению изменению константы диссоциации K_d при заменах заряженных аминокислотных остатков ВН3 пептида белка Вах на аланин [14].

6.5. Критерий стабильности белкового комплекса ($\lg(\text{cond}(W))$) попарного электростатического взаимодействия потенциальной энергии аминокислотных остатков, позволяет оценить диапазон разброса значений K_d и указывать какие замены в пептидах будут приводить к уве-

личению/уменьшению стабильности биологического комплекса при их связывании с целевыми белками. Таким образом, перед проведением дорогостоящего трудоемкого эксперимента, когда необходимо синтезировать высокоселективный пептид, который будет характеризоваться высокой аффинностью к одному белку и низкой аффинностью к другому белку, то разработанный нами метод позволит свести к минимуму количество проводимых экспериментов по поиску такого пептида, путем теоретического расчета заданного диапазона для высоких и низких значений K_d .

6.6. Разработанный в диссертации биофизический подход позволяет качественно определять ключевые аминокислотные остатки при взаимодействии двух полипептидных цепей, а так же оценивать диапазон изменения K_d при замене ключевых аминокислотных остатков в пептидах при их связывании к целевым белкам.

6.7. Разработаны карты потенциальной энергии электростатического взаимодействия попарно взятых аминокислотных остатков участвующих белков, на примере Nap1–Nap1, которые позволяют наглядно увидеть характер образования белкового комплекса, идентифицировать максимумы и минимумы потенциальной энергии между аминокислотными остатками двух белков, определять ключевые аминокислотные остатки, на которые приходятся максимальные значения потенциальной энергии. Особое внимание уделено природе взаимодействующих аминокислотных остатков (гидрофобные, гидрофильные, заряженные).

6.8. На основе разработанной в диссертации модели появилась возможность количественной оценки гидрофобного эффекта методами компьютерного моделирования: рассчитать значение потенциальной энергии электростатического взаимодействия между каждой парой гидрофобных аминокислотных остатков двух полипептидных цепей белков с учетом конформации.

Таким образом, мы можем прогнозировать устойчивость белковых комплексов, качественно определять константу диссоциации, синтезировать пептиды с заданной константой диссоциации к различным белкам, при этом позволяя увеличивать избирательность пептидов, увеличивая сродство к одним белкам и уменьшая к другим, что является важным условием усовершенствования пептидной терапии и определяет научную новизну представленной работы.

Применение разработанных математических алгоритмов в диссертации позволит находить оптимальные пептиды с учетом сродства к их мишениям и разрабатывать в будущем ингибиторы или активаторы белков-мишней.

ВЫВОДЫ

Введенный критерий – число обусловленности матрицы, элементами которой являются потенциальные энергии электростатического взаимодействия между попарно взятыми аминокислотными остатками может служить:

- в качестве критерия стабильности биологической структуры;
- для исследования процессов фосфорилирования;
- для определения локализации активных участков белков.
- для качественного согласования с константой диссоциации пептидов к полноразмерным белкам путем сопоставления с численными значениями логарифма числа обусловленности матрицы ($\lg(\text{cond}(W))$), элементами которой являются потенциальные энергии электростатического взаимодействия между попарно взятыми аминокислотными остатками белков;
- для определения влияния точечных замен в пептидах на устойчивость образованного комплекса с целыми белками.

Таким образом, разработанный и физически обоснованный в диссертации математический подход в дополнение к работам по молекулярной динамике, позволит теоретически изучать влияние фосфорилирования аминокислотных остатков полипептидной цепи на образование биологических комплексов, определять нахождение активных участков белков и выявлять стабильность различных участков белковых комплексов путем анализа матрицы потенциальной энергии электростатического взаимодействия между различными сайтами биологического комплекса, исследовать влияние точечных замен в BH3-пептидах на стабильность образованного ими биологического комплекса с проапоптическими белками семейства Bcl-2, а также оценивать диапазон изменения K_d при замене ключевых аминокислотных остатков в пептидах при их связывании к целевым белком.

В перспективе это позволит решать фундаментальные и прикладные проблемы медицины

Цитируемая литература

1. Демчук О.Н., Карпов П.А., Блюм Я.Б. Докинг низкомолекулярных лигандов на молекуле растительного FtsZ-белка: применение технологии CUDA для ускорения расчетов. // Цитология и генетика. 2012. N.3. С.55–64.
2. Семчиков Ю.Д. Высокомолекулярные соединения. М.: Академия, 2010.
3. Fenley A.T., Adams D.A., Onufriev A.V. //Biophys. J. 2010. Vol.99. P. 1577-1585.
4. Gerstein M. & Richards F.M. Protein Geometry: Volumes, Areas, and Distances. Yale University, 1977.
5. Biro J.C.//Theoretical biology and medical modelling, 2006 V. 3. N.15, Pp.1-12.
6. Алмазов А.Б., Павлоцкий И.П. Вероятностные методы в теории полимеров М.:Наука,1971.
7. Рыскин Я.И., Ставицкая Г.П. Водородная связь и структура гидросиликатов. Л.: Наука, 1972.
8. Teufel D.P., Bycroft M., and Fersht A.R. Regulation by phosphorylation of the relative affinities of the N-terminal transactivation domains of p53 for p300 domains and Mdm2.//Oncogene. 2009. V.28. N.20. Pp. 2112-2118.
9. Grossman S.R. p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response//Eur J. Biochem. 2001. V. 268 N.10. Pp.2773-2778.
10. Moll U.M., Petrenko O. The MDM2-p53 Interaction.//Mol Cancer Res. 2003 V. 1. N.14. Pp.1001-1008.
11. Leslie P.L., Ke H., Zhang Y. The MDM2 RING and central acidic domains play distinct roles in MDM2 homodimerization and MDM2-MDMX heterodimerization //J. Biol. Chem. 2015. V.290. N.20. Pp.12941-12950.
12. Park Y.J., Luger K. The structure of nucleosome assembly protein 1.// Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006.Vol. 103. N 5. Pp. 1248-1253.
13. Ku B., Liang C., Jung J.U., Oh B.H., Bonsu Ku., Chengyu L., Jae U. J., Byung-Ha O. Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX.//Cell Research. 2011. V.21. Pp.627–641.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. Koshlan T.V. Mathematical Modeling of Protein Complexes./ Koshlan T.V., Kulikov K.G.// Springer-Nature,2018,Pp.367.
2. Кошлан Т.В. Математическое моделирование взаимодействия белковых молекул и прогнозирование их реакционной способности/Кошлан Т.В., Куликов К.Г // Журнал технической физики. 2016. Т. 86. № 10. С. 131-138..
3. Кошлан Т.В. Математическое моделирование образования гистонового октамера. /Кошлан Т.В., Куликов К.Г //Журнал технической физики. 2017. Т. 87. № 5. С. 665-671.
4. Кошлан Т.В. Математическое моделирование образования комплекса белковых молекул с учетом их доменной структуры./Кошлан Т.В., Куликов К.Г // Журнал технической физики. 2017. Т. 87. № 4. С. 489-497.
5. Кошлан Т.В. Математическое моделирование влияния температуры на характер связывания мономерных белков в водных растворах./Кошлан Т.В., Куликов К.Г // Журнал технической физики. 2017. Т. 87. № 11. С. 1734-1741.
6. Кошлан Т.В., Куликов К.Г. Математическое моделирование линейного докинга. Ч.1 Определение участков связывания между белковыми молекулами. Журнал технической физики. 2018. Т. 88. № 8. С. 1137-1149.
7. Кошлан Т.В., Куликов К.Г. Математическое моделирование линейного докинга. Ч.2 Определение влияния точечных мутаций на сродство между белковыми молекулами. Журнал технической физики. 2018. Т.88. № 8. С. 1150-1159.
8. Koshlan T.V. Mathematical modeling of the formation of biological complexes based on site-directed mutagenesis/Koshlan T.V., Kulikov K.G. // EMBO Conference: Molecular Machines: Integrative Structural and Molecular Biology. 2016, 20-23 November, Heidelberg , Germany.
9. Koshlan T.V. Mathematical modeling studies of the stability complex biological systems in the case of the interaction of histone proteins H2A, H2B, H3 and H4 in vitro/Koshlan T.V., Kulikov K.G.//EMBO Conference: Molecular Machines: Integrative Structural and Molecular Biology. 2016, 20-23 November, Heidelberg, Germany.
10. Koshlan T.V. Mathematical modeling to predict the reactivity of Nap1 with histone proteins based on their domain structure/Koshlan T.V., Kulikov K.G.// EMBO Conference: Molecular Machines: Integrative Structural and Molecular Biology.2016, 20-23 November,Heidelberg, Germany.
11. Koshlan T.V. Physical modeling of structure formation of the histone dimers H2A, H2B, H3 and H4 /Koshlan T.V., Kulikov K.G.// Proteomic Forum 2017, 2-5 April. Potsdam, Germany.
12. Koshlan T.V. Physical modeling of the influence of phosphorylation and dephosphorylation processes the p53 protein on its binding with proteins Mdm2 and p300 /Koshlan T.V., Kulikov K.G.// Proteomic Forum 2017, 2-5 April. Potsdam, Germany.
13. Koshlan T.V. A mathematical model of temperature aggregation of protein structures in aqueous solutions/Koshlan T.V., Kulikov K.G.// Proteomic Forum 2017, 2-5 April. Potsdam, Germany.

14. Koshlan T.V. Maps interaction protein complexes/Koshlan T.V., Kulikov K.G.//Proteomic Forum 2019, 24-28 March. Potsdam, Germany.

15. Koshlan T.V. The role of electrostatic interaction in the formation of protein complexes, for example proteins p53, p63 and p73/Koshlan T.V., Kulikov K.G.// Proteomic Forum 2019, 24-28 March. Potsdam, Germany.

16. Koshlan T.V. Qualitative analysis of the dissociation constant (K_d) in the interaction of peptides with full-length proteins/Koshlan T.V., Kulikov K.G.// Proteomic Forum 2019, 24-28 March. Potsdam, Germany.