

Отчёт по проведенному моделированию подвижности белка с ковалентными связями между цистеинами в дисульфидных мостиках и без них.

Основные рабочие файлы можно посмотреть в репозитории [GitHub](#).

Методика и параметры получения траектории.

Прежде всего я скачала и посмотрела структуру белка в PyMOL. Стоит отметить, что сам по себе белок согласно классификации CATH относится к 3.30.1350.10 (3 - Alpha Beta, 3.30 - 2-Layer Sandwich, 3.30.1350 - Crambin, 3.30.1350.10 - Thionin-like). В исходном pdb (или cif) файле было 7 аминокислот (THR2, ILE7, VAL8, ARG10, SER22, ILE25, ILE34) в нескольких альтернативных конформациях (видимо для остатков, расположенных на поверхности белка труднее однозначно определить положение атомов радикала из-за их динамичности). Например,

| | | | | | | | | | | | |
|------|-----|----|------|---|---|-------|-------|--------|------|------|---|
| ATOM | 111 | CB | AVAL | A | 8 | 4.063 | 1.695 | 12.923 | 0.70 | 3.19 | C |
| ATOM | 112 | CB | BVAL | A | 8 | 4.269 | 1.433 | 13.215 | 0.30 | 9.52 | C |

Поэтому, я просмотрела всю структуру и удалила дублирующие координаты атомов, чтобы получить правдоподобные структуры. При кристаллизации белка в структуру вошла молекула этанола, которую я тоже удалила, поскольку это просто растворитель, из которого был получен кристалл, и он не имеет никакого отношения к самой структуре белка. Таким образом очищенный файл я сохранила для дальнейшей работы как abcsys.pdb.

Поскольку необходимо было получить структуру и без дисульфидных связей, то я в удалила данные связи в abcsys.pdb и добавила водороды к атомам серы. После чего сохранила структуру в файл abnocys.pdb (на самом деле этого можно было не делать, поскольку PyMOL данные файлы читает и рисует одинаково, а определить наличие или отсутствие дисульфидных связей можно на этапе создания топологии при помощи gmx pdb2gmx).

Топологии я собрала из стандартной библиотеки силовых полей гromакса с использованием AMBER99SB-ILDN protein, nucleic AMBER94 (Lindorff-Larsen et al., Proteins 78, 1950-58, 2010) при помощи следующей команды:

```
gmx pdb2gmx -f abcsys.pdb -o abnocys.gro -p abnocys.top -i abnocys.itp -ss -ignh
```

Ключ -ss позволил создать 2 разные топологии белков с CYX (-S-S-) и CYS (-SH) остатками цистеина.

Далее при помощи следующей последовательности команд я создала water box с белками:

```
gmx editconf -f abnocys.gro -o indent -d 1.5  
gmx solvate -cp indent.gro -cs spc216.gro -p abnocys.top -o solv.gro
```

Поскольку система не несет заряда (при создании топологии: Total charge 0.000 e), то нет необходимости нейтрализовать заряд при помощи добавления ионов, поэтому далее я минимизировала и уравнивала систему (рисунок 1):

```
gmx grompp -f enmin.mdp -c solv.gro -p abnocys.top -o abnocys_enmin
gmx mdrun -deffnm abnocys_enmin -ntmpi 1 -ntomp 8 -pin on -pinoffset 0 -pinstride 2
-update gpu -nb gpu -bonded gpu -pme gpu -notunepme -pmefft gpu -gpu_id 0 -v
```

Аналогично для eq_nvt.mdp и eq_npt.mdp.

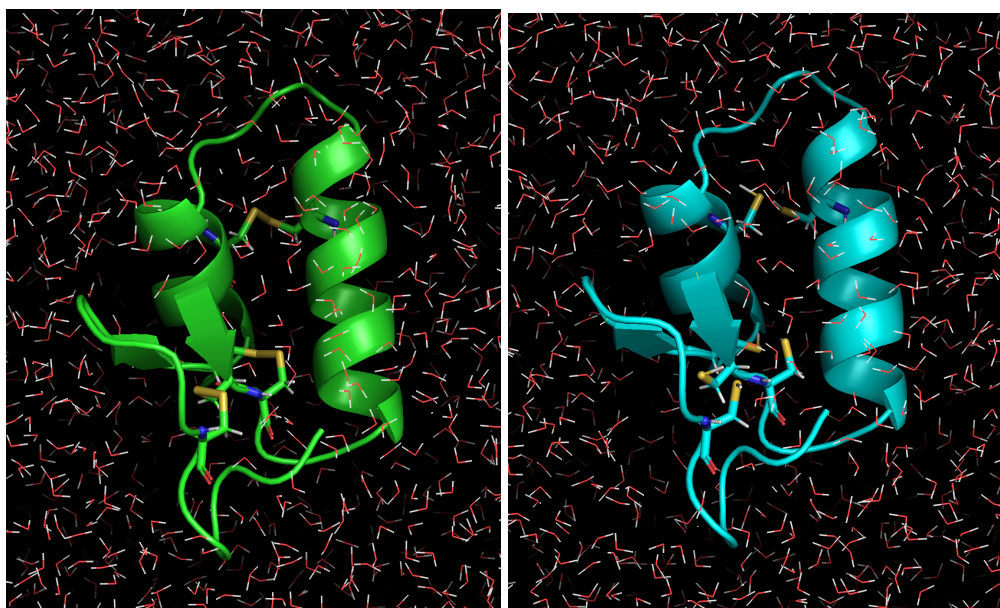


Рисунок 1. Визуализация в PyMOL структур (слева - есть дисульфидные связи, справа - нет дисульфидных связей) после минимизации энергии и NVT- и NPT-уравниваний.

Таким образом, системы для проведения молекулярной динамики были готовы.

Основные молекулярные динамики я проводила на сервере своего научного руководителя, за что ему большое спасибо. Длительность динамик 50 нс (25 000 000 шагов по 2 фс). Все файлы, которые использовались при получении структур и траекторий можно посмотреть в репозитории GitHub.

Анализ траектории

Оценить подвижность белков можно построив графики зависимости каких либо параметров системы от времени симуляции. Такими параметрами может являться:

- среднеквадратичное отклонение структур от исходной (референсной структуры) на траектории - `gmx rms` (-prev если необходимо сравнить покадрово) ;
- среднеквадратичное отклонение положения атомов аминокислотных остатков от исходных на траектории - `gmx rmsf`.

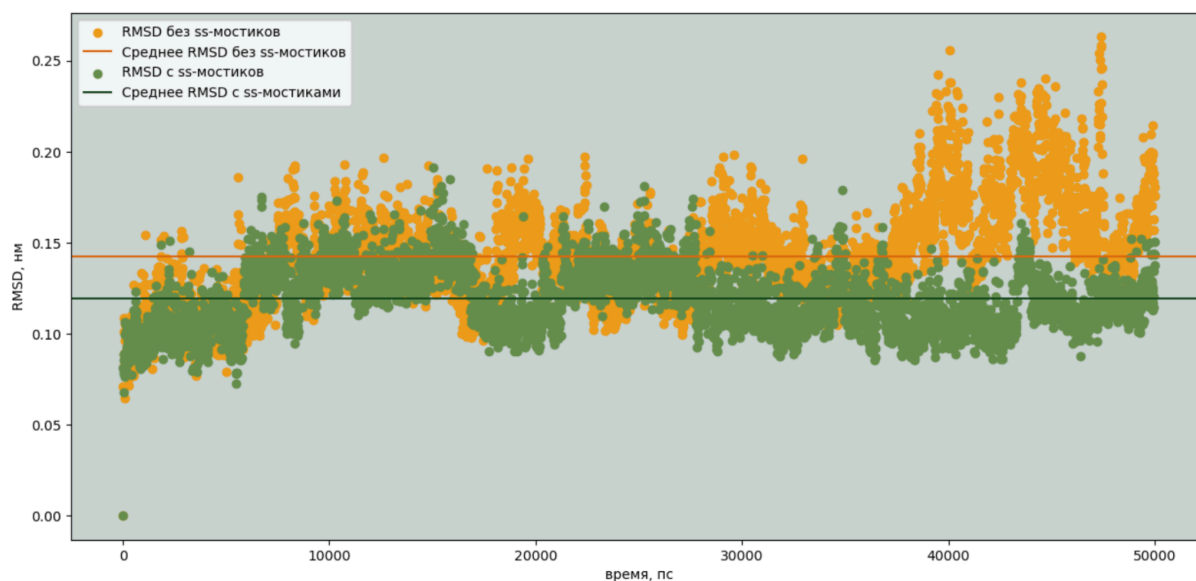


График 1. Среднеквадратичное отклонения структуры от исходной с течением времени.

Из графика 1 видно, что в среднем отличие структур от исходной (референсной) в случае отсутствия дисульфидных связей в белке больше, чем при их наличии.

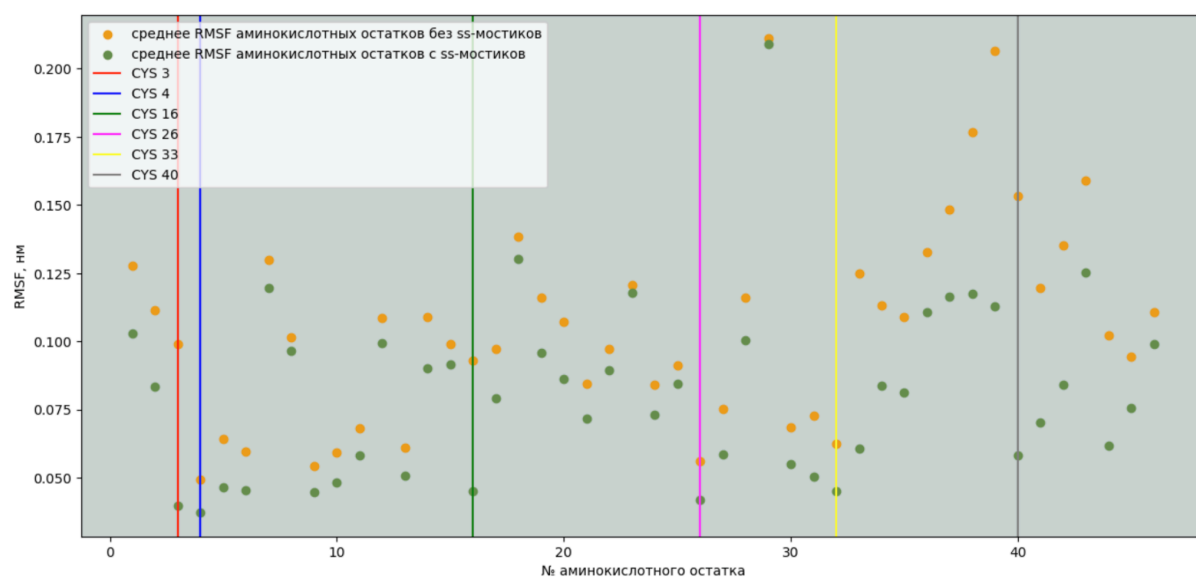
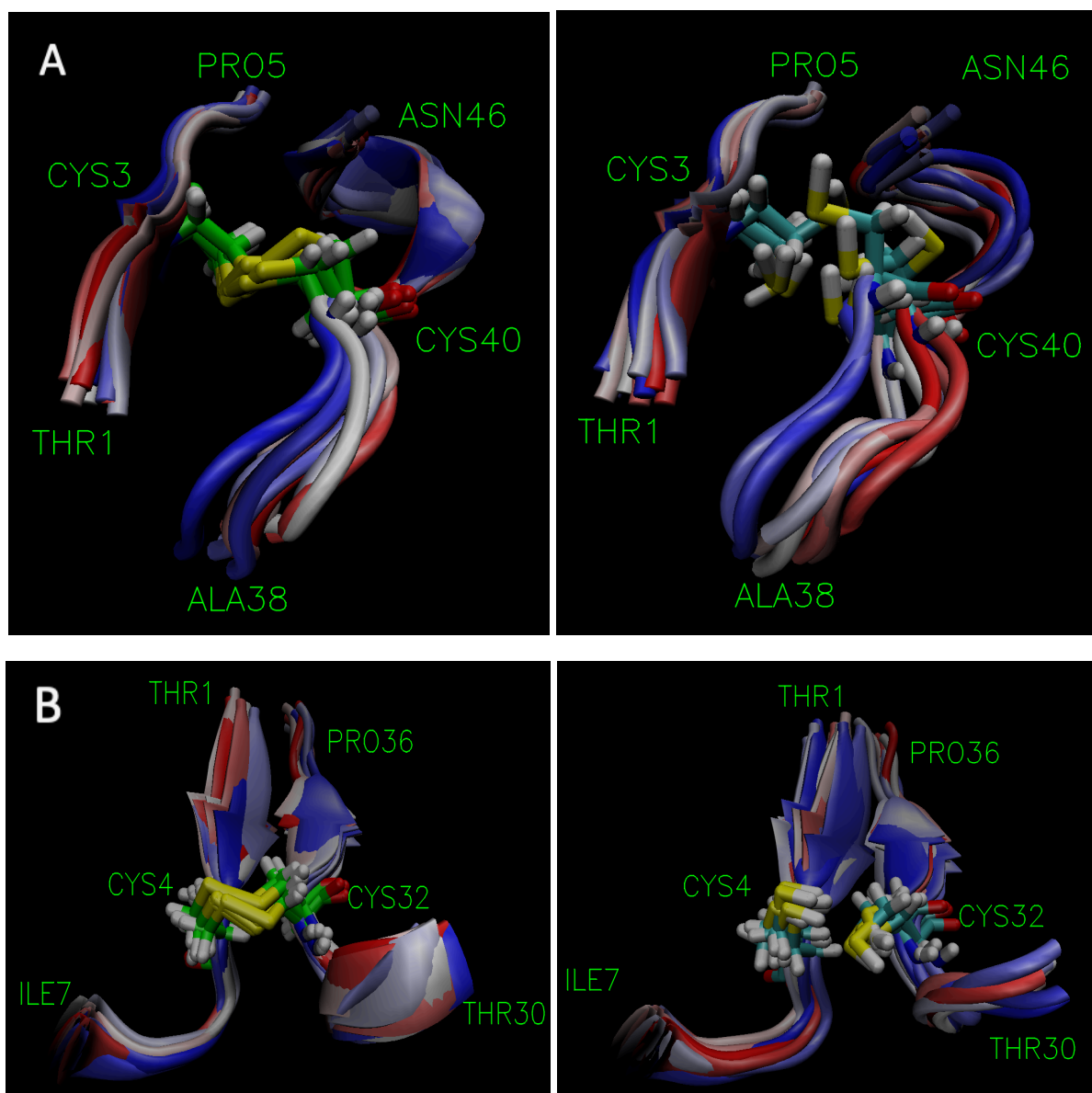


График 2. Среднеквадратичное отклонения атомных позиций аминокислотных остатков от исходных с течением времени. Вертикальными линиями отмечены остатки цистеинов.

Из графика 2 следует, что все атомные позиции аминокислотных остатков отклоняются от исходных в ходе траектории, причем RMSF для остатков белка без дисульфидных связей выше для каждой аминокислоты. Наиболее сильное отклонение позиций наблюдается для С-конца белка, поскольку он не структурирован. Однако данная подвижность значительно возрастает для белка без дисульфидной связи между CYS40 и CYS3 (рисунок 2, А). Таким образом, можно сделать вывод, что хотя С-конец

белка обладает повышенной подвижностью по сравнению с остальными структурными элементами, его положение стабилизируется в случае наличия S-S связей, что приводит к значительно меньшей подвижности по сравнению с системой без дисульфидного мостика.

Интересно поведение остатков цистеина в двух альфа-спиралях: подвижность спиралей относительно друг друга настолько возрастает, что цистеиновые остатки отворачиваются друг от друга и находятся на расстоянии 7 Å (рисунок 2, С, слева, расстояние не показано). Однако положение цистеинов в бета листе достаточно стабильное (рисунок 2, В).



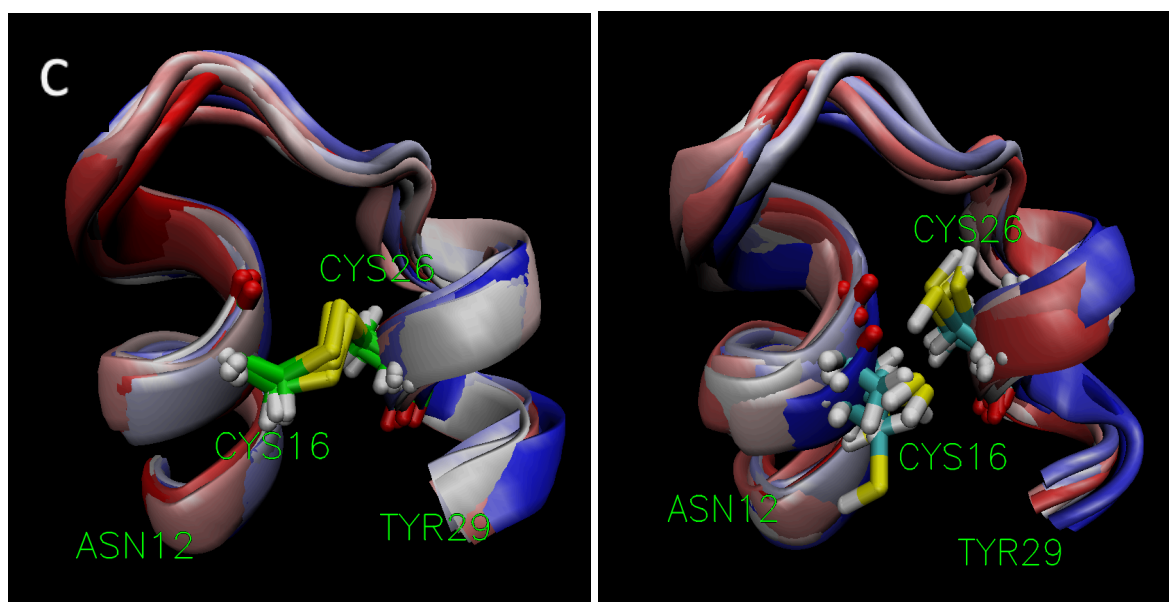


Рисунок 2. Визуализация в VMD каждого 10-ого кадра траектории в случае наличия (левая колонка) и отсутствия (правая колонка) дисульфидных связей. Окрашены полипептидные цепи в зависимости от последовательности кадров от наиболее красного, через белый цвет и к синему. Остатки цистеина показаны для каждого 5-ого кадра траектории. А. Участки с аминокислотными остатками 1-5 и 38-46 полипептидной цепи. В. Участки с аминокислотными остатками 1-7 и 30-36 полипептидной цепи. С. Участки с аминокислотными остатками 12-29 полипептидной цепи. Из рисунков для всех участков видна высокая подвижность полипептидной цепи в случае отсутствия дисульфидных связей, поскольку наложение цепей во времени друг на друга представляет собой более диффузное расположение.

Итак, можно сделать вывод о большей подвижности белка без дисульфидных связей, которые выполняют роль определенных фиксаторов структуры за счет сохранения межатомного расстояния и ориентации атомов цистеиновых аминокислотных остатков, что в свою очередь ограничивает движение белка в целом.