

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ПРИКЛАДНОЙ МАТЕМАТИКИ И ИНФОРМАТИКИ**

Кафедра биоинформатики

Реферат

По лекциям:

Лекция 6. *Экспериментальные методы определения пространственной структуры белков*

Лекция 7. *Межмолекулярные взаимодействия белок-лиганд*

Лекция 9. *Энергетические параметры связывания лигандов с белками*

Лекция 10. *Методы молекулярной механики (молекулярная статика)*

Благодарного Артёма Андреевича
студента 4 курса, 3 группы
специальности «Информатика»
дисциплина «Моделирование
биомолекул»

Минск, 2025

Лекция 6. Экспериментальные методы определения пространственной структуры белков

Введение Пространственная структура белка (третичная и четвертичная) определяет его функцию. Понимание того, как полипептидная цепь сворачивается в трехмерном пространстве, является ключом к пониманию молекулярных механизмов жизни, разработке лекарств (drug design) и инженерии белков. Существует несколько фундаментальных методов получения структур высокого разрешения, каждый из которых имеет свои преимущества, недостатки и области применения.

1. Фибриллярные белки

Общая характеристика

Фибриллярные (волоконистые) белки представляют собой особый класс белков, которые, в отличие от глобулярных белков, образуют длинные нитевидные структуры. Их основная функция — структурная и механическая: они обеспечивают форму клеток, целостность тканей, защиту и подвижность.

Ключевые особенности:

- **Геометрия:** Высокое соотношение длины к диаметру (аспектное соотношение).
- **Растворимость:** Большинство фибриллярных белков нерастворимы в воде и разбавленных солевых растворах из-за высокого содержания гидрофобных аминокислот на поверхности, способствующих агрегации в волокна.
- **Вторичная структура:** Обычно характеризуются регулярной и повторяющейся вторичной структурой (только α -спирали или только β -листы) на больших участках цепи.

Основные представители

К фибриллярным белкам относятся кератины (волосы, ногти), коллаген (соединительная ткань), эластин (связки), фиброин (шелк) и миозин (мышцы).

2. Структуры фибриллярных белков

Пространственная организация фибриллярных белков основана на упаковке вторичных структур в супервторичные комплексы. Рассмотрим три классических мотива.

А. α -кератин и структура “Coiled-coil” (Сверхспираль)

α -кератины являются основой волос, шерсти и рогового слоя кожи.

- **Первичная структура:** характеризуется гептадным повтором $(a - b - c - d - e - f - g)_n$, где позиции a и d — гидрофобные аминокислоты (например, лейцин, изолейцин), а остальные — полярные или заряженные.
- **Пространственная структура:** Две правозакрученные α -спирали переплетаются друг с другом, образуя левозакрученную суперспираль (coiled-coil).

- **Стабилизация:** Гидрофобные остатки (*a* и *d*) образуют “полосу” вдоль спирали. При скручивании двух спиралей эти полосы скрываются внутри интерфейса контакта (эффект “knobs-into-holes” — выступы во впадины), изолируясь от воды. Дополнительную прочность придают дисульфидные мостики между цепями.

Б. Коллаген и тройная спираль

Коллаген — самый распространенный белок у млекопитающих.

- **Первичная структура:** Строгий повтор **Gly-X-Y**, где X — часто пролин, а Y — часто 4-гидроксипролин. Глицин необходим, так как только он помещается в плотный центр спирали.
- **Пространственная структура:** Три левозакрученные полипролиновые спирали (тип II, не путать с классической α -спиралью) скручиваются вместе в одну правозакрученную **тройную суперспираль** (тропоколлаген).
- **Стабилизация:** Водородные связи между NH-группой глицина одной цепи и CO-группой остатка другой цепи. Гидроксилирование пролина (требует витамина C) критически важно для термостабильности.

В. Фиброин шелка и β -структуры

Белок, выделяемый шелкопрядами и пауками.

- **Первичная структура:** Большое количество повторов (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser).
- **Пространственная структура:** Антипараллельные β -складчатые листы.
- **Упаковка:** Листы укладываются слоями. Боковые цепи глицина (просто -H) с одной стороны листа смотрят на глицины соседнего листа, а аланины/серины с другой стороны взаимодействуют с аланинами/серины. Это обеспечивает очень плотную упаковку (“молния”).
- **Свойства:** Нерастяжимость (так как полипептидная цепь в β -листе уже максимально вытянута), но гибкость за счет слабых ван-дер-ваальсовых взаимодействий между слоями.

3. Рентгеноструктурный анализ (РСА / X-ray Crystallography)

РСА исторически является “золотым стандартом”, давшим миру более 85% всех известных структур белков.

Принцип метода

Метод основан на явлении дифракции рентгеновских лучей на электронной оболочке атомов в кристаллической решетке. Так как длина волны рентгеновского излучения (~ 1 Å) сопоставима с длиной ковалентных связей, это позволяет разрешать атомную структуру.

Основные этапы

1. **Кристаллизация (узкое место):**
 - Белок должен быть получен в чистом виде и в высокой концентрации.

- Используется метод диффузии паров (висячая или сидячая капля), где раствор белка медленно теряет воду, достигая пересыщения, что заставляет молекулы белка упорядоченно выстраиваться в кристалл.
2. **Сбор данных:**
- Кристалл помещают под пучок рентгеновских лучей (часто на синхротронах для высокой интенсивности).
 - Кристалл вращают, регистрируя “рефлексы” (дифракционные пятна) на детекторе. Положение пятен зависит от параметров кристаллической ячейки, а интенсивность — от расположения атомов внутри ячейки.
3. **Обработка данных и Фазовая проблема:**
- Детектор регистрирует только интенсивность волн, но теряет информацию об их фазах. Без фаз невозможно восстановить изображение (обратное преобразование Фурье).
 - **Решение фазовой проблемы:**
 - *Молекулярное замещение (MR)*: Использование известной структуры гомологичного белка как модели.
 - *Изоморфное замещение (MIR)*: Введение в кристалл тяжелых атомов (Au, Pt, Hg), которые сильно рассеивают лучи и служат реперами.
 - *Аномальное рассеяние (MAD/SAD)*: Использование перестраиваемой длины волны рентгеновского излучения (часто на атомах селена в селенометионине).
4. **Построение модели и уточнение (Refinement):**
- Расчет карты электронной плотности.
 - Вписывание аминокислотной последовательности в эту карту (building).
 - Минимизация разницы между экспериментальными данными и теоретической моделью (R-фактор).

Ограничения метода

- **Кристаллизация:** Многие белки (особенно мембранные или с гибкими участками) не кристаллизуются.
- **Статичность:** Метод дает “замороженный” снимок структуры, часто искаженный плотной упаковкой в кристалле (crystal contacts), что может не отражать динамику в растворе.
- **Водород:** Рентгеновские лучи плохо рассеиваются на легких атомах, поэтому атомы водорода обычно не видны (если разрешение не субатомное, $<1.0 \text{ \AA}$).

4. Спектроскопия ЯМР (Ядерный Магнитный Резонанс)

ЯМР-спектроскопия высокого разрешения — единственный метод, позволяющий определять атомную структуру белков в растворе при условиях, близких к физиологическим.

Физические основы

Метод основан на магнитных свойствах атомных ядер с ненулевым спином (^1H , ^{13}C , ^{15}N). Во внешнем сильном магнитном поле эти спины расщепляются по энергии. При облучении радиочастотным импульсом происходит резонансное поглощение энергии.

Подготовка образца

Обычные изотопы углерода (^{12}C) и азота (^{14}N) не подходят для ЯМР белков. Поэтому белок экспрессируют в бактериях на среде, обогащенной изотопами ^{13}C и ^{15}N .

Этапы конформационного анализа

1. Регистрация спектров:

- Снимаются многомерные спектры (2D, 3D, 4D), такие как HSQC (корреляция H-N), HNCA, HNCO и др.

2. Отнесение сигналов (Assignment):

- Каждому пику в спектре сопоставляется конкретный атом конкретной аминокислоты в последовательности. Это похоже на сборку пазла, где “соседи” по ковалентным связям находятся через эксперименты типа COSY/TOCSY или тройного резонанса.

3. Сбор структурных ограничений (Restraints):

- **NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy):** Самый важный этап. Интенсивность кросс-пика в спектре NOESY пропорциональна $1/r^6$, где r — расстояние между ядрами в пространстве (обычно $< 5\text{-}6 \text{ \AA}$). Это дает информацию о том, какие атомы сближены пространственно, даже если они далеки по цепи.
- **J-constants:** Дают информацию о торсионных углах (ϕ, ψ).
- **RDC (Residual Dipolar Couplings):** Дают информацию об ориентации векторов связей относительно глобальной оси молекулы.

4. Расчет структуры:

- Используются методы молекулярной динамики или имитации отжига (simulated annealing) для сворачивания цепи так, чтобы удовлетворить всем экспериментальным ограничениям (расстояниям и углам).
- Результат ЯМР — это не одна структура, а **ансамбль** (семейство) моделей, удовлетворяющих экспериментальным данным. Толщина “пучка” линий отражает гибкость участков белка.

Ограничения метода

- **Размер белка:** Фундаментальное ограничение. С ростом размера молекулы она медленнее вращается в растворе, что приводит к уширению линий спектра. Традиционный предел $\sim 30\text{-}35$ кДа. Методы типа TROSY подняли планку до ~ 100 кДа, но это все еще меньше, чем возможности PCA или Крио-ЭМ.
- **Растворимость:** требуется высокая концентрация белка (~ 1 мМ) без агрегации, что сложно для многих белков.

5. Cryo-электронная микроскопия (Cryo-EM)

Метод, переживший “революцию разрешения” (Resolution Revolution) в 2010-х годах и получивший Нобелевскую премию по химии в 2017 году. Позволяет изучать крупные макромолекулярные комплексы без кристаллизации.

Принцип метода

Используется просвечивающий электронный микроскоп (ТЕМ). Электроны имеют длину волны намного меньше света, что теоретически позволяет видеть атомы. Однако биологические образцы разрушаются под мощным пучком электронов. Крио-ЭМ решает эту проблему использованием слабых пучков и заморозкой.

Этапы и технологии

1. Витрификация (Vitrification):

- Тонкий слой раствора белка наносится на сетку с отверстиями.
- Сетка мгновенно погружается в жидкий этан (-180°C). Скорость охлаждения настолько высока, что вода не успевает кристаллизироваться в лед (который разрушил бы структуру и дал дифракцию), а переходит в аморфное стекловидное состояние.

2. Сбор данных:

- Образец облучается пучком электронов. Получаются 2D-проекции молекул, лежащих в случайных ориентациях во льду.
- **Прямые детекторы электронов (Direct Electron Detectors):** Ключевая инновация. Они позволяют снимать не статичный кадр, а “кино” (movie mode). Это позволяет программно компенсировать движение частиц под ударами электронов (motion correction), что резко повышает четкость.

3. Обработка данных (Single Particle Analysis):

- Из микрофотографий “вырезаются” сотни тысяч отдельных частиц.
- Компьютерные алгоритмы классифицируют их по ориентации (2D classes).
- Создается 3D-реконструкция (карта плотности) путем обратного проецирования.
- Карта уточняется до высокого разрешения, после чего в нее вписывается атомная модель (как в РСА).

Преимущества и место метода

- Не нужны кристаллы.
- Требуется очень мало белка.
- **Анализ гетерогенности:** В отличие от РСА (где нужен один конформер для кристалла), Крио-ЭМ позволяет программно разделить смесь конформаций (например, “открытый” и “закрытый” канал) из одной пробы и реконструировать их по отдельности.
- Идеален для огромных комплексов (рибосомы, вирусы), недоступных ЯМР.

6. Банк данных белков (Protein Data Bank, PDB)

Все экспериментально полученные структуры депонируются в единый мировой архив.

Организация

PDB управляется консорциумом wwPDB (США, Европа, Япония). Каждой структуре присваивается уникальный 4-значный идентификатор (PDB ID), например, 1CRN или 6VXX.

Форматы данных

- **.pdb (Legacy):** Старый формат с фиксированной шириной колонок. Не поддерживает очень большие структуры (не хватает колонок для номеров атомов > 99,999).
- **.mmCIF (macromolecular Crystallographic Information File):** Современный стандарт. Гибкий формат “ключ-значение”, без ограничений на размер системы.

Содержание файла

Файл PDB содержит:

1. **Метаданные:** Метод (РСА/ЯМР/ЭМ), разрешение (в Å), организм, авторы, условия эксперимента.
2. **Координаты:** Список атомов (АТОМ) с их координатами X, Y, Z, фактором заселенности (occuранcy) и температурным фактором (B-factor), который отражает локальную подвижность атома.

Значение для биоинформатики

PDB является фундаментом структурной биоинформатики. Данные из банка используются для:

- Обучения алгоритмов предсказания структуры (AlphaFold основан на данных PDB).
- Виртуального скрининга лекарств (докинг).
- Поиска структурных гомологов.

Заключение Современная структурная биология опирается на триаду методов: **РСА** обеспечивает высочайшее разрешение для жестких белков любого размера (при условии кристаллизации); **ЯМР** дает информацию о динамике и структуре в растворе для небольших белков; **Крио-ЭМ** доминирует в изучении крупных надмолекулярных комплексов и мембранных белков. Данные всех этих методов аккумулируются в **PDB**, создавая базу для понимания живой материи на атомном уровне.

Лекция 7. Межмолекулярные взаимодействия белок-лиганд

Введение Биологические процессы не протекают в вакууме; они являются результатом динамических взаимодействий. Связывание белка с лигандом (малой молекулой, другим белком или ДНК) — это ключевое событие передачи сигнала, иммунного ответа и ферментативного катализа. Понимание этих взаимодействий на атомарном уровне позволяет создавать новые терапевтические агенты.

1. Электронная криомикроскопия белков (Cryo-EM) в контексте взаимодействий

Хотя мы касались Cryo-EM ранее, важно рассмотреть этот метод именно в контексте изучения комплексов «белок-лиганд».

Революция разрешения и визуализация комплексов. Долгое время Cryo-EM считалась «блобологией» (blobology) из-за низкого разрешения. Однако «Революция разрешения» (внедрение прямых детекторов электронов и новых алгоритмов) позволила достигать разрешения 1.5–2.5 Å. Этого достаточно, чтобы уверенно видеть не только остов белка, но и плотность, соответствующую малым молекулам лекарств, ионов и воды.

Преимущества для изучения взаимодействий:

3. **Отсутствие кристаллических контактов:** В РСА плотная упаковка кристалла может блокировать активный центр или искажать поверхностные петли. Cryo-EM показывает молекулу в растворе, в более нативном состоянии.
4. **Захват различных конформационных состояний:** при связывании лиганда белок часто меняет форму. Cryo-EM позволяет в одной пробе увидеть популяцию молекул в состоянии *Apo* (без лиганда) и *Holo* (с лигандом), а также промежуточные состояния. Это дает возможность реконструировать «кино» аллостерического перехода.
5. **Крупные комплексы:** Cryo-EM идеальна для изучения мембранных рецепторов (GPCR, ионные каналы) в комплексе с агонистами или токсинами. Эти белки крайне трудно кристаллизовать, но именно они являются мишенями для 60% современных лекарств.

2. Банк данных белков (Protein Data Bank, PDB) как ресурс взаимодействий

PDB — это не просто архив координат, это основной инструмент для анализа взаимодействий.

Структура данных о лигандах:

- **НЕТАТМ (Heteroatoms):** В файлах PDB координаты атомов белков описываются тегом ATOM, а координаты лигандов, ионов и воды — тегом HETATM.
- **Chemical Component Dictionary (CCD):** Каждому уникальному лиганду в PDB присваивается трехбуквенный код (например, ATP для аденозинтрифосфата или

ASM для аспирина). Биоинформатики используют эти коды для поиска всех структур, содержащих конкретное лекарство.

Валидация взаимодействий: Современные инструменты PDB (Validation Reports) оценивают не только геометрию белка, но и качество «вписывания» лиганда в карту электронной плотности (Real Space Correlation Coefficient — RSCC). Это критично, так как исследователи иногда ошибочно помещают молекулу лекарства в шум электронной плотности.

Биоинформатический анализ: на основе данных PDB создаются специализированные базы данных (например, PDBbind), которые связывают 3D-структуру комплекса с экспериментальными данными о силе связывания (аффинности). Это основа для обучения нейросетей предсказывать, как сильно новое лекарство свяжется с белком.

3. Белок-белковые (PPI) и белок-лигандные взаимодействия

Взаимодействия макромолекул управляются законами термодинамики и набором слабых (нековалентных) сил.

Типы сил

Взаимодействия носят обратимый характер, что обеспечивается слабыми связями:

6. **Электростатические взаимодействия:** Притяжение между противоположно заряженными группами (например, Asp^- и Arg^+). Это дальнodelствующие силы, часто направляющие лиганд в “устье” активного центра (steering effect).
7. **Водородные связи:** Направленные взаимодействия между донором протона (группы -NH, -OH) и акцептором (O, N). Обеспечивают специфичность связывания (узнавание).
8. **Ван-дер-Ваальсовы силы:** Слабые взаимодействия, возникающие при очень близком контакте атомов (индуцированные диполи). Критически зависят от плотности упаковки (комплементарности формы).
9. **Гидрофобный эффект:** Ключевой драйвер связывания. Вода вокруг гидрофобных поверхностей белка и лиганда образует упорядоченную структуру (низкая энтропия). При связывании лиганда эта вода вытесняется в раствор, становясь хаотичной (рост энтропии $\Delta S > 0$). Согласно уравнению Гиббса ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$), рост энтропии делает процесс энергетически выгодным.

Термодинамика связывания

Сила взаимодействия описывается **константой диссоциации** (K_d):

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

Где $[P]$ — концентрация свободного белка, $[L]$ — лиганда, $[PL]$ — комплекса. Чем меньше K_d , тем сильнее связывание.

- Лекарства обычно имеют K_d в диапазоне наномолей (10^{-9} M).

- Природные субстраты — микромолей (10^{-6} М).

4. Комплементарность

Комплементарность — это взаимное соответствие двух молекул, обеспечивающее высокую специфичность и сродство.

Виды комплементарности

10. **Стерическая (геометрическая):** Выступы на одной молекуле соответствуют впадинам на другой. Это минимизирует пустые полости и максимизирует Ван-дер-Ваальсовы контакты.
11. **Электростатическая:** Распределение положительных и отрицательных зарядов на поверхности лиганда зеркально отражает заряды в кармане связывания.
12. **Химическая:** Расположение доноров и акцепторов водородных связей должно совпадать пространственно.

Модели связывания

13. **Ключ и замок (Эмиль Фишер, 1894):** Жесткое соответствие. Активный центр заранее имеет форму, идеально подходящую для субстрата. Эта модель устарела, так как не объясняет стабилизацию переходного состояния.
14. **Индукированное соответствие (Дэниел Кошланд, 1958):** “Перчатка и рука”. Активный центр гибок и принимает нужную форму только при приближении субстрата.
15. **Конформационная селекция (Conformational Selection):** Белок в растворе существует как ансамбль быстро меняющихся форм. Лиганд выбирает и стабилизирует ту форму, к которой он лучше всего подходит.

5. Активный центр белка и его взаимодействия с лигандом

Активный центр — это специализированный участок на поверхности белка (обычно углубление или щель), где происходит связывание и катализ.

Характеристики активного центра:

- **Микроокружение:** Свойства аминокислот внутри кармана могут сильно отличаться от свойств в растворе. Например, pK_a остатка может сдвигаться, делая его более реакционноспособным (общая кислотно-основная активация).
- **Десольватация:** Карман часто является гидрофобным, исключая молекулы воды. Это усиливает электростатические взаимодействия, так как диэлектрическая проницаемость среды внутри белка ниже, чем в воде.
- **Функциональные группы:**
 - *Якорные остатки:* отвечают за удержание субстрата (специфичность).
 - *Каталитические остатки:* непосредственно участвуют в разрыве/образовании связей (например, нуклеофильная атака).

6. Ферменты – ускорители химических реакций

Ферменты — это белковые катализаторы, ускоряющие реакции в $10^6 - 10^{17}$ раз по сравнению с некатализируемыми процессами.

Механизм действия

Ферменты **не меняют** термодинамическое равновесие реакции (энергию Гиббса продуктов и реагентов). Они **снижают энергию активации** (ΔG^\ddagger) — энергетический барьер, который нужно преодолеть для превращения субстрата в продукт.

Теория переходного состояния

Лайнус Полинг постулировал, что фермент комплементарен не самому субстрату (Ground State), а **переходному состоянию** (Transition State) — короткоживущей, высокоэнергетической форме молекулы на вершине энергетического барьера. Связывая переходное состояние сильнее, чем субстрат, фермент стабилизирует его и ускоряет реакцию.

Пример: Сериновые протеазы (Химотрипсин)

- *Каталитическая триада (Asp-His-Ser)*: Аспартат ориентирует гистидин, который отнимает протон у серина, превращая серин в мощный нуклеофил (алкоксид-ион).
- *Оксианионная дыра*: Участок активного центра, стабилизирующий отрицательный заряд кислорода, возникающий в переходном состоянии тетраэдрического интермедиата.

7. Лиганды: Агонисты и Антагонисты

Эти термины используются преимущественно в фармакологии при описании взаимодействия лигандов с **рецепторами**.

Агонисты

Лиганды, которые при связывании с рецептором переводят его в активную конформацию, вызывая биологический ответ.

- **Полные агонисты**: вызывают максимальный возможный ответ (как эндогенный лиганд).
- **Частичные агонисты**: вызывают ответ меньше максимального, даже при полном насыщении рецепторов.
- **Обратные агонисты**: связываются с рецептором, который обладает спонтанной активностью (работает без лиганда), и *подавляют* эту активность.

Антагонисты

Лиганды, которые связываются с рецептором, но **не вызывают** его активации. Их главная цель — блокировать связывание агониста. Они обладают сродством (аффинностью), но не внутренней активностью (efficacy).

- **Конкурентные антагонисты:** связываются с тем же участком (ортостерическим сайтом), что и агонист. Их действие можно преодолеть, увеличив концентрацию агониста.
- **Неконкурентные антагонисты (Аллостерические):** связываются с другим участком (аллостерическим сайтом). Это вызывает изменение формы рецептора так, что агонист больше не может связаться или активировать рецептор. Увеличение дозы агониста не помогает.

Биоинформатический аспект: при разработке лекарств важно понимать, ищем ли мы ингибитор (антагонист) для блокировки вредного процесса или активатор (агонист) для восполнения дефицита функции. Моделирование (докинг) позволяет предсказать, стабилизирует ли молекула активную или неактивную конформацию белка.

Лекция 9. Энергетические параметры связывания лигандов с белками

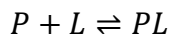
Введение Процесс образования комплекса [Белок-Лиганд] (Protein-Ligand binding) не является магическим совпадением форм. Это физический процесс, управляемый фундаментальными законами термодинамики. Для рационального дизайна лекарств (Rational Drug Design) недостаточно найти молекулу, которая геометрически подходит к активному центру. Необходимо, чтобы это состояние было энергетически более выгодным, чем состояние, когда белок и лиганд находятся раздельно в растворителе.

1. Аффинность лиганда к белку (Степень сродства)

Аффинность (сродство) — это количественная мера силы взаимодействия между двумя молекулами. В биохимии и биоинформатике она описывает, насколько охотно лиганд связывается с белком и насколько устойчив образовавшийся комплекс.

Константа диссоциации (K_d)

Основной метрикой аффинности является равновесная константа диссоциации. Рассмотрим реакцию:



Где P — белок, L — лиганд, PL — комплекс.

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

- **Физический смысл:** K_d равна концентрации лиганда, при которой занято 50% сайтов связывания белка.
- **Интерпретация:** чем меньше значение K_d , тем выше аффинность (комплекс более стабилен и распадается неохотно).
 - Миллимолярный диапазон ($10^{-3} M$): очень слабое связывание (часто неспецифическое).
 - Микромолярный диапазон ($10^{-6} M$): Умеренное связывание (характерно для многих метаболитов).
 - Наномолярный диапазон ($10^{-9} M$): Сильное связывание (цель для большинства лекарственных препаратов).
 - Пикомолярный диапазон ($10^{-12} M$): очень сильное связывание (антитела, ингибиторы с высокой потентностью).

Также используется константа ассоциации $K_a = 1/K_d$, но в профессиональной среде K_d является стандартом.

2. Энергия Гиббса (ΔG_{bind})

Свободная энергия Гиббса — это главный термодинамический потенциал, определяющий направление химической реакции.

Фундаментальное уравнение

Связь между термодинамикой и кинетикой (аффинностью) описывается уравнением:

$$\Delta G_{bind} = RT \ln(K_d)$$

Где:

- R — универсальная газовая постоянная (1.987 кал/(моль·К)).
- T — абсолютная температура (в Кельвинах).

Критерии самопроизвольности:

- Если $\Delta G < 0$ (отрицательная), реакция протекает самопроизвольно (экзергонический процесс), комплекс образуется.
- Чем более отрицательно значение ΔG , тем сильнее связывание.

Для справки: изменение ΔG всего на **-1.4 ккал/моль** приводит к увеличению аффинности (K_d) в **10 раз**. Это означает, что даже одна слабая водородная связь или оптимизация Ван-дер-Ваальсового контакта может радикально улучшить лекарство.

Уравнение Гиббса-Гельмгольца раскладывает свободную энергию на две составляющие:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Это уравнение показывает, что аффинность — это баланс между **энтальпией** (ΔH) и **энтропией** (ΔS).

3. Энтальпия (ΔH)

Энтальпия отражает тепловой эффект реакции связывания. В контексте взаимодействия белок-лиганд энтальпия связана с образованием и разрывом нековалентных связей.

Природа энтальпийного вклада

- **Экзотермический процесс ($\Delta H < 0$):** Выделение тепла. Обычно это желаемый сценарий, указывающий на образование сильных специфических контактов между лигандом и белком.
- **Эндотермический процесс ($\Delta H > 0$):** Поглощение тепла.

Источники энтальпии:

16. **Водородные связи:** Образование связи между донором и акцептором в активном центре выделяет энергию.
17. **Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия:** Множество слабых контактов при идеальной упаковке (комплементарности форм) дает значительный суммарный выигрыш в энтальпии.
18. **Электростатика:** Ионные мостики (солевые мостики) между заряженными группами.

Проблема десольватации: важно понимать, что лиганд в растворе уже образует водородные связи с водой. Чтобы связаться с белком, он должен разорвать связи с водой (затрата энергии, $\Delta H > 0$) и образовать новые с белком (выигрыш энергии, $\Delta H < 0$).

Итоговая энтальпия связывания — это разница между энергией контактов «Лиганд-Белок» и энергией контактов «Лиганд-Вода» + «Белок-Вода». Если новые связи не сильнее старых, энтальпийный выигрыш будет нулевым или отрицательным.

4. Энтропия (ΔS)

Энтропия — это мера беспорядка или степени свободы системы. В связывании лигандов энтропия играет двоякую и часто решающую роль.

Гидрофобный эффект (Выигрыш энтропии, $\Delta S > 0$)

Это главный драйвер связывания для большинства лекарств.

- **Механизм:** Гидрофобные участки лиганда и белка в воде окружены “клеткой” из высокоупорядоченных молекул воды (клатратная структура).
- **Связывание:** при контакте гидрофобных поверхностей белка и лиганда эти молекулы воды вытесняются в общий объем растворителя (Bulk water).
- **Результат:** Упорядоченная вода становится хаотичной. Беспорядок системы растет ($\Delta S > 0$). Поскольку в уравнении $-T\Delta S$, положительная энтропия дает отрицательный вклад в ΔG , способствуя связыванию.

Конформационная энтропия (Проигрыш энтропии, $\Delta S < 0$)

Подробнее рассматривается в разделе 7, но суть в том, что фиксация гибкого лиганда в жестком активном центре уменьшает беспорядок, что энергетически невыгодно.

Энтальпийно-энтропийная компенсация: часто при попытке улучшить энтальпию (добавить Н-связь), мы делаем молекулу жестче или требуем более строгой ориентации, что приводит к проигрышу в энтропии. Это главная головная боль медицинских химиков.

5. Оценка энергии образования комплекса лиганд/белок

Как мы узнаем значения ΔG , ΔH и ΔS ?

Экспериментальные методы

19. **Изотермическая титрационная калориметрия (ИТС):** Золотой стандарт. Метод измеряет тепло, выделяемое или поглощаемое при постепенном добавлении лиганда к белку. ИТС позволяет напрямую определить K_d , ΔH и стехиометрию (n). ΔG и ΔS рассчитываются математически.
20. **Поверхностный плазмонный резонанс (SPR):** измеряет кинетику (k_{on} , k_{off}), из которой вычисляется K_d , но не дает прямого разделения на энтальпию и энтропию без проведения экспериментов при разных температурах (анализ Вант-Гоффа).

Вычислительные методы (Bioinformatics & CADD)

21. **Скор-функции (Scoring functions) в докинге:** Быстрые алгоритмы, которые аппроксимируют ΔG как сумму слагаемых (VdW + H-bonds + Electrostatics + Desolvation). Точность невысока (ошибка 2-3 ккал/моль), но подходит для скрининга.
22. **MM-PBSA / MM-GBSA:** Механика молекул + Пуассон-Больцман (или обобщенный Борн) + Площадь поверхности. Более точный метод оценки свободной энергии на основе траекторий молекулярной динамики. Учитывает влияние растворителя.
23. **Free Energy Perturbation (FEP):** “Алхимические” превращения. Самый точный и ресурсоемкий метод. Вычисляет разницу энергий при плавном превращении одного лиганда в другой в процессе симуляции.

6. Вклады отдельных взаимодействий в энергию связывания

Суммарная свободная энергия складывается из аддитивных вкладов различных сил. Ниже приведены *примерные* величины энергий для биологических систем (в вакууме они сильнее, но вода ослабляет их):

24. **Ионные связи (Солевые мостики):**
 - $\Delta G \approx -1.5$ до -5 ккал/моль.
 - Самые сильные, дальнodelствующие, но сильно зависят от pH и ионной силы раствора.
25. **Водородные связи:**
 - $\Delta G \approx -0.5$ до -1.5 ккал/моль (нейтральные).
 - $\Delta G \approx -3.0$ до -4.0 ккал/моль (заряженные).
 - Критически важны для *специфичности* (правильной ориентации), но дают умеренный вклад в общую *аффинность* из-за штрафа за десольватацию.
26. **Катион-π взаимодействия:**
 - Взаимодействие положительного заряда (напр., Lys, Arg, или лиганд-амин) с электронным облаком ароматического кольца (Phe, Tyr, Trp).
 - Очень значимы в нейрорецепторах.
27. **Ван-дер-Ваальсовы силы (Дисперсионные):**
 - Очень слабые по одиночке (< -0.1 ккал/моль на атом).
 - Однако, поскольку атомов сотни, суммарный вклад огромен при условии **комплементарности формы**.

7. Энтропийные потери энергии при связывании

Это “энергетический налог”, который лиганд платит за связывание с белком. Чтобы комплекс был стабилен, выигрыш от энтальпии и гидрофобного эффекта должен превышать эти потери.

Потеря трансляционной и вращательной энтропии ($\Delta S_{trans+rot}$)

В растворе лиганд свободно перемещается (трансляция) и кувыркается (вращение) во всех трех осях. При связывании он фиксируется в активном центре. Он теряет 6 степеней свободы.

- Это “плата за вход”. Она примерно постоянна для молекул одного размера.

Потеря конформационной энтропии (ΔS_{conf})

В растворе гибкий лиганд постоянно меняет форму, вращаясь вокруг одинарных связей. В активном центре он обычно зафиксирован в одной конкретной биоактивной конформации.

- **Замораживание вращающихся связей (Rotatable bonds):** Каждая замороженная связь “стоит” примерно **0.5 – 0.7 ккал/моль** штрафа свободной энергии ($T\Delta S$).
- **Принцип “жесткого аналога”:** это объясняет, почему медицинские химики стараются сделать лекарства жесткими (циклизация, введение двойных связей). Жесткая молекула уже находится в нужной конформации и **не теряет** энтропию при связывании (предоплаченный налог), что резко повышает аффинность.

Заключение Эффективное связывание лиганда — это тонкая оптимизация. Необходимо максимизировать энтальпию (идеальные контакты), максимизировать гидрофобный эффект (вытеснение воды) и минимизировать энтропийные штрафы (использовать жесткие молекулярные каркасы). Современная биоинформатика пытается предсказать этот баланс *in silico*, экономя годы лабораторных экспериментов.

Лекция 10. Методы молекулярной механики (молекулярная статика)

Введение Молекулярная механика (ММ) — это вычислительный метод моделирования молекулярных систем, который рассматривает атомы не как квантово-механические системы с волновыми функциями, а как классические частицы (сферические массы), взаимодействующие по законам классической физики Ньютона. Этот подход позволяет рассчитывать энергию и структуру огромных биомолекул (белков, ДНК, вирусов), что невозможно сделать методами квантовой химии из-за вычислительной сложности.

1. Методы эмпирических силовых полей

Суть молекулярной механики заключается в использовании **эмпирических силовых полей**. Термин “эмпирический” означает, что параметры уравнений (длины связей, жесткость пружин, заряды атомов) не выводятся из первых принципов физики каждый раз заново, а берутся из экспериментальных данных (РСА, спектроскопия) или высокоточных квантовых расчетов малых молекул.

Модель “Шарики и пружинки” (Ball-and-Spring model):

- **Атомы** представляются как заряженные сферы определенной массы и радиуса.
- **Химические связи** представляются как механические пружины, соединяющие атомы.
- **Электроны** не рассматриваются явно. Вся электронная оболочка “свернута” в эффективный заряд атома и параметры Ван-дер-Ваальса. Это означает, что **классическая ММ не может моделировать разрыв или образование ковалентных связей** (химические реакции), только конформационные изменения.

2. Потенциальная функция (Внутренняя энергия системы)

Сердцем любого метода молекулярной механики является **потенциальная функция энергии** (U или E_{total}). Это уравнение, которое связывает координаты всех атомов системы (пространственную структуру) с ее потенциальной энергией.

Общее уравнение выглядит так:

$$E_{total} = E_{bonded} + E_{non-bonded}$$

Где энергия делится на валентные (связанные) и невалентные взаимодействия.

Развернутая формула обычно имеет вид:

$$E_{total} = \sum E_{bond} + \sum E_{angle} + \sum E_{dihedral} + \sum (E_{vdW} + E_{elec})$$

Компоненты потенциальной функции:

28. **Растяжение связей (E_{bond}):** описывается законом Гука (гармонический потенциал). Штраф за отклонение длины связи от равновесной.

$$E_{bond} = k_b(r - r_0)^2$$

29. **Изменение валентных углов (E_{angle}):** также гармонический потенциал. Штраф за отклонение угла между тремя атомами.

$$E_{angle} = k_\theta(\theta - \theta_0)^2$$

30. **Торсионные (диздральные) углы** ($E_{dihedral}$): описывает вращение вокруг одинарных связей. Это периодическая функция (косинус), отвечающая за поворотную изомерию.

$$E_{dihedral} = K_{\phi}[1 + \cos(n\phi - \delta)]$$

3. Силовое поле молекулярной механики

Понятие “**Силовое поле**” (**Force Field**) в биоинформатике включает в себя две составляющие:

31. **Функциональная форма:** Набор уравнений (описанных выше), определяющих вид зависимости энергии от координат.
32. **Набор параметров:** Конкретные численные значения для всех констант (k_b , r_0 , заряды q , радиусы атомов) для каждого типа атома в каждой аминокислоте.

Популярные силовые поля для белков:

- **AMBER:** (Assisted Model Building with Energy Refinement) — одно из самых старых и популярных полей.
- **CHARMM:** (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) — широко используется для моделирования мембран и белков.
- **GROMOS:** Силовое поле, часто используемое в пакете GROMACS.
- **OPLS:** Оптимизировано для жидких сред.

Различие между ними заключается в способе получения параметров (из экспериментов или квантовых расчетов) и балансе между различными типами взаимодействий.

4. Межмолекулярные взаимодействия в приближении силового поля

Это невалентные взаимодействия ($E_{non-bonded}$), которые происходят между атомами, не связанными ковалентно (либо принадлежащими разным молекулам, либо находящимися далеко друг от друга в цепи одной молекулы). Именно они определяют третичную структуру белка (“сворачивание”).

В классическом силовом поле они рассчитываются как сумма парных взаимодействий по всем парам атомов (i, j):

А. Электростатические взаимодействия (E_{elec})

Описываются законом Кулона:

$$E_{elec} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

Где q — частичные заряды атомов, r_{ij} — расстояние.

- **Проблема:** Электростатика — дальнедействующая сила ($1/r$). Расчет всех пар N^2 очень дорог вычислительно.

- **Решение:** Использование радиуса обрезания (cutoff) или методов суммирования Эвальда (PME) для учета дальних взаимодействий.
- **Диэлектрическая проницаемость (ϵ):** внутри белка $\epsilon \approx 2 - 4$ (гидрофобная среда), а в воде $\epsilon \approx 80$. Это различие критически важно учитывать.

Б. Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия (E_{vdW})

Описывают баланс между притяжением на средних дистанциях и отталкиванием на очень малых. Обычно моделируются потенциалом Леннарда-Джонса.

5. Потенциал Леннарда-Джонса

Потенциал “6-12” Леннарда-Джонса — это стандартный способ описания Ван-дер-Ваальсовых сил в молекулярной механике.

Формула:

$$V(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

Или в более простом виде:

$$E_{LJ} = \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6}$$

Физический смысл слагаемых:

33. Слагаемое притяжения $-\left(\frac{\sigma}{r}\right)^6$ (Силы Лондона):

- Возникает из-за корреляции мгновенных диполей. Электронные облака двух нейтральных атомов синхронизируют свои флуктуации, что приводит к притяжению.
- Быстро убывает с расстоянием ($1/r^6$).

34. Слагаемое отталкивания $+\left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12}$ (Паулиевское отталкивание):

- Моделирует “жесткость” атомов. Когда атомы сближаются слишком сильно, их электронные облака начинают перекрываться. Согласно принципу запрета Паули, это вызывает резкий рост энергии.
- Степень 12 выбрана не из фундаментальной физики (там скорее экспонента), а для удобства вычислений (это квадрат от r^6).

Параметры:

- ϵ (epsilon) — глубина потенциальной ямы (сила притяжения).
- σ (sigma) — расстояние, на котором энергия равна нулю (столкновительный диаметр).
- r_{min} — расстояние, соответствующее минимуму энергии (равновесный контакт).
 $r_{min} = 2^{1/6}\sigma$.

6. Методы минимизации функции потенциальной энергии

Молекулярная статика (или геометрическая оптимизация) — это процесс поиска такой конфигурации атомов, при которой потенциальная энергия системы минимальна. Цель: найти состояние, где силы, действующие на атомы, равны нулю ($\nabla E = 0$). Это соответствует стабильной конформации молекулы.

Система находится на многомерной поверхности потенциальной энергии (PES). Задача минимизатора — “скатиться” в ближайшую яму.

Основные алгоритмы:

35. Метод наискорейшего спуска (Steepest Descent):

- На каждом шаге сдвигает атомы в направлении, обратном градиенту энергии (направлении силы).
- *Плюсы:* очень надежен (robust), хорошо работает, когда структура далека от равновесия (высокая энергия, “плохие” контакты).
- *Минусы:* очень медленно сходится вблизи минимума, начинает “вилять” зигзагами.

36. Метод сопряженных градиентов (Conjugate Gradient):

- Использует информацию о предыдущем шаге, чтобы скорректировать направление спуска.
- *Плюсы:* сходится намного быстрее, чем Steepest Descent.
- *Применение:* обычно используют Steepest Descent для первых 100-1000 шагов (убрать грубые наложения атомов), а затем переключаются на Conjugate Gradient для точной доводки.

37. Метод Ньютона-Рафсона (Newton-Raphson):

- Использует вторые производные энергии (матрицу Гессе).
- *Плюсы:* находит минимум за минимальное число шагов.
- *Минусы:* требует огромных вычислительных затрат на расчет и хранение матрицы Гессе ($3N \times 3N$), поэтому редко применяется для больших белков.

7. Проблемы теоретических подходов к предсказанию 3D структуры

Несмотря на мощь молекулярной механики, предсказание структуры белка “с нуля” (ab initio folding) только на основе минимизации энергии сталкивается с фундаментальными проблемами.

Проблема локальных минимумов (Multiple Minima Problem)

Поверхность потенциальной энергии белка изрезана миллионами локальных минимумов.

- Методы минимизации (статики) находят только *ближайший* локальный минимум. Если начать минимизацию с вытянутой цепи, белок просто немного сожмется, но не свернется в правильную глобулу.

- Нативный фолд — это глобальный минимум свободной энергии, и найти его перебором невозможно (парадокс Левинталя).

Энтропийный фактор

Молекулярная статика минимизирует **Потенциальную энергию** (E или H). Однако в реальности системы стремятся к минимуму **Свободной энергии Гиббса** ($G = H - TS$).

- Статика полностью игнорирует энтропию (S).
- Вклад конфигурационной энтропии и энтропии растворителя (гидрофобный эффект) критически важен. Статика может показать, что плотно упакованный белок стабилен по энтальпии, но не учесть энтропийную стоимость сворачивания.

Влияние растворителя

Учет воды усложняет расчеты в разы.

- *Явный растворитель (Explicit)*: Тысячи молекул воды вокруг белка. Очень точно, но очень медленно.
- *Неявный растворитель (Implicit)*: Вода заменяется на математический континуум с диэлектрической проницаемостью. Быстро, но менее точно (игнорирует водородные связи с конкретными молекулами воды).

Точность силовых полей

Силовые поля — это аппроксимации. Они могут переоценивать стабильность одних вторичных структур (например, α -спиралей) по сравнению с другими, что приводит к ошибкам в предсказании финальной укладки.

Заключение Молекулярная механика и минимизация энергии — это необходимый первый шаг в любой работе с белковыми структурами (например, для снятия напряжения в кристаллических структурах или после докинга). Однако для изучения процессов сворачивания и реальной динамики необходим переход от **Статики** к **Молекулярной Динамике (MD)**, которая добавляет кинетическую энергию и позволяет преодолевать барьеры локальных минимумов.