

На правах рукописи

Шайтан Алексей Константинович

**Компьютерное моделирование и статистический
анализ самоорганизующихся молекулярных
систем на основе пептидов**

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2010

Работа выполнена на кафедре физики полимеров и кристаллов физического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
академик РАН
Хохлов Алексей Ремович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук
Василевская Валентина Владимировна

кандидат физико-математических наук
Балабаев Николай Кириллович

Ведущая организация: Институт высокомолекулярных соединений РАН

Защита состоится “21” апреля 2010 г. в 16-30 на заседании диссертационного совета Д 501.002.01 в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, МГУ, физический факультет, ауд. ЮФА.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова.

Автореферат разослан “18” марта 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

Лаптинская Т.В.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа посвящена изучению самоорганизующихся молекулярных структур на основе поли- и олигопептидов. Проведены исследования молекул как природного (белки), так и синтетического (гибриды синтетических полимеров и пептидов) происхождения методами компьютерного моделирования и статистического анализа (анализ пространственных структур белков). Отдельная глава диссертации посвящена изучению процессов гидратации аминокислот у поверхности воды, расчёту термодинамических параметров гидратации и адсорбции.

Актуальность работы

Актуальность выбранного направления исследований связана с повышенным вниманием мирового научного сообщества в последнее время к созданию новых материалов и соединений на основе биоинспирированных подходов, использованию принципов самоорганизации биологических макромолекул при создании умных полимеров, при разработке новых веществ и материалов. Для достижения этой цели существует два принципиальных подхода: (I) создание биомиметических синтетических полимеров путём дизайна их последовательностей и подбора свойств звеньев на основе принципов, заимствованных у природных макромолекул, и (II) создание гибридов синтетических полимеров и биополимеров, позволяющее заимствовать принципы организации и свойства биологических молекул вместе с “материальным носителем”.

Одним из серьёзных успехов биомиметического подхода явилось создание “белковоподобных” сополимеров – линейных макромолекул со специальной статистикой последовательности, способных формировать водорастворимые глобулы благодаря концентрации гидрофобных звеньев в ядре глобулы, а гидрофильных на поверхности. Создание и изучение таких сополимеров из различных типов звеньев требует описания свойств звеньев в терминах их сродства к водному окружению, поверхности, неполярному окружению. Особый интерес представляет влияние свойств звеньев на их положение в структуре полимер-

ных глобул. Изучению обозначенных вопросов на примере природных белков и их звеньев (аминокислот) посвящены главы 3 и 4 диссертационной работы.

Для создания гибридов синтетических полимеров и биомолекул особый интерес представляют пептидные последовательности, способные к образованию бета-листов. Такие последовательности при определённых условиях могут приводить к межмолекулярной агрегации с образованием фибриллярных структур в нанометровом диапазоне подобных амилоидным фибриллам, встречающимся при ряде заболеваний (например, болезни Альцгеймера). Сопряжение самоорганизационных свойств таких последовательностей с полупроводящими, оптическими, флюоресцентными свойствами некоторых синтетических полимеров путём их ковалентного соединения открывает большие перспективы во многих областях: микроэлектронике, сенсорных и биосенсорных технологиях и т.д. Такие гибридные соединения уже синтезированы экспериментально, однако не до конца ясными остаются вопросы, связанные со структурой получаемых агрегатов, а также представления о рациональном дизайне таких структур с заданными свойствами. Исследованию этого вопроса методами молекулярной динамики на конкретном примере посвящена глава 5 диссертационной работы.

Несмотря на бурный прогресс экспериментальных методов, методы компьютерного моделирования и статистического анализа лишь увеличивают свою актуальность. В биологии это связано с необходимостью обработки огромных массивов экспериментальных данных в автоматическом режиме: последовательностей нуклеотидов, аминокислот, пространственных структур белков и т.д. Методы компьютерного моделирования молекулярных систем из первых принципов (*ab initio*) благодаря развитию суперкомпьютеров и технологий параллельных вычислений, позволяют моделировать системы всё большего масштаба и находить новые точки соприкосновения между экспериментальными результатами и моделированием.

Цель диссертационной работы

Целью диссертационной работы является изучение самоорганизующихся молекулярных структур на основе поли- и олигопептидов методами молекуляр-

ной динамики, а также статистического анализа известных пространственных структур полипептидов.

Конкретные **задачи** работы включают в себя:

- Изучение процессов гидратации аминокислот на поверхности воды.
- Создание метода расчёта свободной энергии адсорбции молекул на границе вода/воздух на основе атомистических моделей веществ. Расчёт энергий адсорбции и гидратации для боковых цепей аминокислот.
- Изучение распределения различных типов аминокислотных остатков между поверхностью и ядром в глобулярных водорастворимых белках на основе анализа поверхности доступной растворителю для экспериментально известных пространственных структур белков.
- Расчёт статистических аналогов свободной энергии переноса аминокислотных остатков из ядра глобулы на поверхность и анализ корреляций этих величин с экспериментально известными распределениями аминокислот и их аналогов между фазами различной полярности.
- Изучение процессов самоорганизации тиофен-пептидных молекул-гибридов в нановолокна. Создание молекулярных моделей нанофибрилл.
- Анализ моделей с применением метода молекулярной динамики и выявление наиболее адекватной модели, соответствующей экспериментальным данным.

Научная новизна

1. Предложена методика расчёта свободной энергии адсорбции для молекул на границе вода-воздух на основе атомистических моделей.
2. Впервые в молекулярном моделировании рассчитаны значения энергии адсорбции для боковых цепей аминокислот на границе вода-воздух, изучены профили свободной энергии и термодинамика гидратации вблизи водной поверхности.

3. Создана эволюционно-независимая выборка полноатомных пространственных структур компактных глобулярных белков из 8000 экземпляров с высоким пространственным разрешением.
4. Впервые построены профили статистической свободной энергии аминокислот в глобулярных белках в зависимости от экспонированности аминокислоты растворителю, показано, что корреляция между статистическими свободными энергиями и коэффициентами распределения аминокислот между различными парами растворителей зависят от критерия разделения аминокислот на “ядерные” и “поверхностные” при подсчёте статистических энергий.
5. Впервые предложены молекулярные модели однослойных и многослойных нановолокон из гибридных молекул, состоящих из тетратиофена и олигопептидной последовательности на основе треонина и валина. Проведена интерпретация экспериментальных данных в рамках предложенных моделей.
6. Предложена методика поэтапного конструирования молекулярных моделей таких гибридных волокон на основе кросс-бета-листовой структуры с использованием метода молекулярной динамики.

Практическая значимость

Разработанные методы оценки свободной энергии адсорбции молекул на границу жидкость/газ или жидкость/жидкость позволяют проводить количественные оценки соответствующих величин *in silico*, что может оказаться весьма полезным для современных научных и технических задач. Кроме того, данный метод позволит проводить дополнительную калибровку и настройку атом-атомных потенциалов (силовых полей) в методах молекулярной механики и динамики для более точного моделирования явлений на границе раздела фаз. В частности, численные результаты данной работы могут применяться для калибровки силовых полей при моделировании белков.

В ходе работы вычислены корреляции между статистическими распределени-

ями аминокислот в белковой глобуле и экспериментальными коэффициентами распределения аминокислот и их боковых цепей между различными растворителями, а также построены профили встречаемости аминокислот в зависимости от их экспонирования к растворителю. Данные результаты могут использоваться для усовершенствования методов QSAR при оценке энергий белковых структур, в частности, при оценке выгодности аминокислотных замен, а также оценке взаимодействия иных молекул с растворителем в ходе молекулярной инженерии белков и разработки лекарств. Полученные статистические потенциалы также могут использоваться для создания огрублённых моделей в компьютерном моделировании белков.

Результаты работы в части моделирования самоорганизующихся нанофибрилл из тиофен-пептидных гибридов представляют практический интерес с точки зрения дизайна и создания перспективных наноматериалов для нужд органической микро- и наноэлектроники, например, создания проводящих нанопроводов, светодиодов, сенсорных систем и т.д.

Апробация работы

Основные результаты работы докладывались и обсуждались на VIII Конференции студентов и аспирантов Учебно-научного центра по химии и физике полимеров и тонких органических плёнок (Москва, Россия, 2004), Международной школе-конференции молодых учёных: Системная биология и Биоинженерия (Москва, Россия, 2005), Малом Полимерном Конгрессе (Москва, Россия, 2005), Четвёртой Всероссийской Каргинской Конференции “Наука о полимерах 21-му веку” (Москва, Россия, 2007), Европейском Полимерном Конгрессе (Москва, Россия, 2005), Третьей Конференции STIPOMAT (Лё Даблере, Швейцария, 2007), Второй Санкт-Петербургской Международной Конференции по НаноБиотехнологиям “НаноБио’08” (Санкт-Петербург, Россия, 2008), Пятой Международной Конференции по Биоинформатике Регуляции и Структуры Генома (Новосибирск, Россия, 2006), Первой международной летней школе - Нано2009: Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах (Московская обл., Россия, 2009).

Публикации

Материалы диссертации опубликованы в 15 печатных работах, из них 6 статей в рецензируемых журналах [A1, A2, A3, A4, A5, A6], 1 статья в сборниках трудов конференций [A7], 1 статья в книге [A8], и 8 тезисов докладов [A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16]

Личный вклад автора состоит в разработке оригинальных алгоритмов и моделей, проведении компьютерного моделирования и статистического анализа, интерпретации и анализе полученных результатов.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа изложена на 150 страницах печатного текста и включает 54 рисунка. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка цитируемой литературы, состоящего из 147 наименований, и 4 приложений.

Содержание работы

Во Введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель и аргументирована научная новизна исследований, показана практическая значимость полученных результатов, представлены выносимые на защиту научные положения.

В первой главе приводится обзор литературы в части принципов самоорганизации белковых и пептид-полимерных структур. Описывается структура и строение аминокислот и пептидов, уровни самоорганизации пространственной структуры белков. Приводится определение амилоидов, рассказывается о кросс-бета листовой структуре и формировании возможных типов амилоидных фибрилл. Затрагиваются вопросы термодинамики формирования белковых глобул. Изложены теоретические основы, объясняющие квазибольцмановское распределение встречаемости структурных элементов в глобулярных белках. Рассказывается о новом направлении в науке о полимерах - создании гибридов синтетических полимеров и пептидов. Приводится обзор литературных данных по гибридам пептидов и олиготиофенов – полимеров, обладающих про-

водимостью/полупроводимостью.

Во второй главе приводится краткое изложение основ метода молекулярной динамики и приводится описание использованных силовых полей. Затрагиваются вопросы вычисления свободных энергий на основе атомистических моделей молекул. Также обсуждается вопрос вычисления молекулярных поверхностей, приводится определение молекулярных поверхностей по Ли-Ричардсу и по Коннолли. Вводится понятие поверхности, доступной растворителю.

Третья глава посвящена изучению термодинамики гидратации боковых цепей аминокислот, а также методологическим аспектам компьютерного моделирования полипептидов методом молекулярной динамики. В ходе работы для 13 веществ-аналогов боковых цепей аминокислот были вычислены профили свободной энергии на границе раздела вода/газ, а также рассчитаны энергии гидратации с использованием метода Беннетта. Особое внимание уделялось качеству получаемых результатов и оценке статистических и систематических ошибок, что позволило получить численные оценки параметров гидратации и адсорбции с высокой точностью. Эти оценки имеют как прикладное, так и методологическое значение, поскольку на их основе можно совершенствовать атомистические модели изучаемых веществ. Результаты опубликованы в работе [A1].

Для анализа были использованы модели 13 веществ-аналогов в представлении силового поля OPLS-AA и модель воды SPC. Была создана молекулярная модель водного слоя в периодических граничных условиях толщиной 4 нм. Модель водного слоя была исследована и верифицирована, были построены профили плотности и ориентаций молекул воды, среднего электрического поля и поверхностного потенциала, рассчитано поверхностное натяжение. Толщина границы раздела вода/пар соответствует предсказаниям теории капиллярных волн.

Для всех исследованных молекул на основе метода молекулярной динамики и алгоритма фиксации центра масс молекулы и водного слоя на заданном расстоянии были рассчитаны профили средней силы по мере продвижения молекулы через водный слой. На основе профиля средней силы был рассчитан

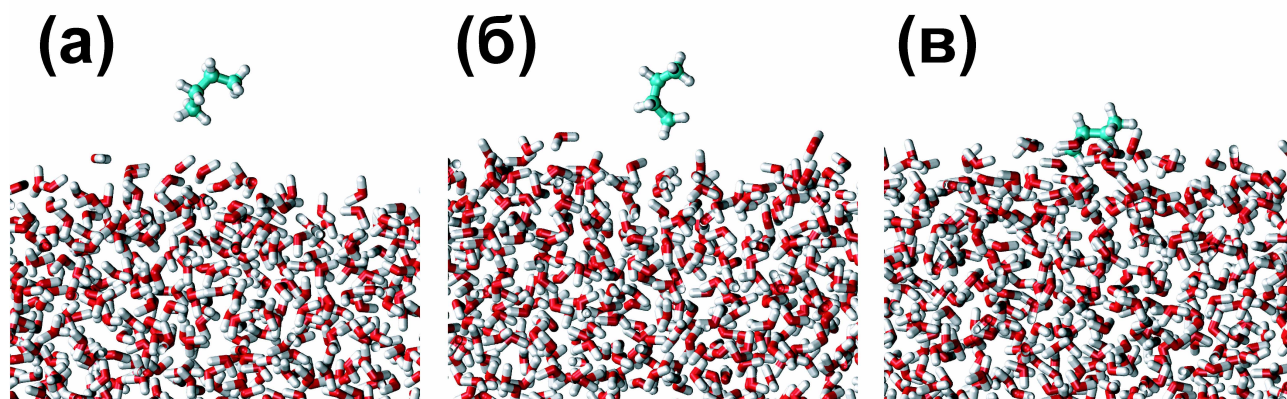
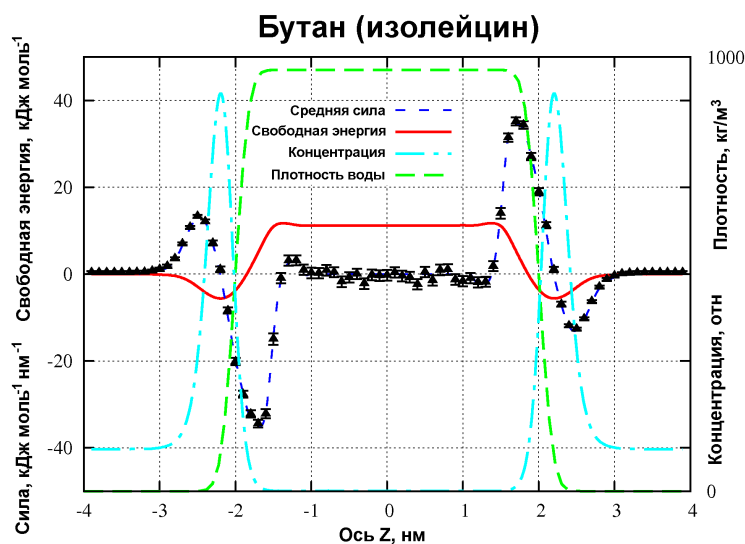


Рис. 1. Мгновенные изображения молекулы бутана во время расчётов на различных расстояниях от границы раздела. Положения соответствующие (а) максимальной силе притяжения, (б) адсорбционному минимуму, (в) максимальной выталкивающей силе.

Рис. 2. Профиль средней силы, свободной энергии и относительной концентрации для молекулы бутана в водном слое. Для сравнения пунктирной линией отмечен профиль плотности водного слоя.



профиль свободной энергии и относительный статистический профиль концентрации вещества (см. Рис. 2). Данные профили для всех веществ были проанализированы. Было показано, что профили средней силы для всех молекул имеют приблизительно одинаковую форму. При расстоянии более 1 нм от поверхности (здесь и далее под положением поверхности понимается положение поверхности Гиббса) нет заметного взаимодействия между молекулой и водным слоем. При дальнейшем приближении к водному слою проявляется сила притяжения, которая, очевидно, обусловлена дисперсионными и электростатическими взаимодействиями. Сила притяжения достигает своего максимума приблизительно на расстоянии 0.5 нм до поверхности Гиббса и далее сходит на нет около границы раздела. Эта область, в которой действует сила притяжения, единственная вносит отрицательный (способствующий гидратации) вклад в энергию гидратации. Приблизительно в районе поверхности Гиббса средняя сила обращается в ноль, что соответствует адсорбционному минимуму на графиках свободной энергии (см. Рис. 2). Визуальное рассмотрение (Рис. 1) показывает, что максимум силы притяжения всё ещё соответствует достаточно удалению молекулы от молекул воды, хотя уже заметно некоторое возмущение водного слоя. Когда молекула продвигается далее внутрь водного слоя, возникает выталкивающая сила, которая препятствует дальнейшему погружению молекулы в воду. Причина этой силы, очевидно, может быть приписана проявлению гидрофобного эффекта: молекула вещества нарушает сеть водородных связей молекул воды, что приводит к потере энтропии молекул воды из-за сниженной подвижности последних вокруг сольватируемой молекулы. Сила выталкивания пропадает при погружении молекулы на глубину 0.5-0.7 нм в зависимости от размера молекулы.

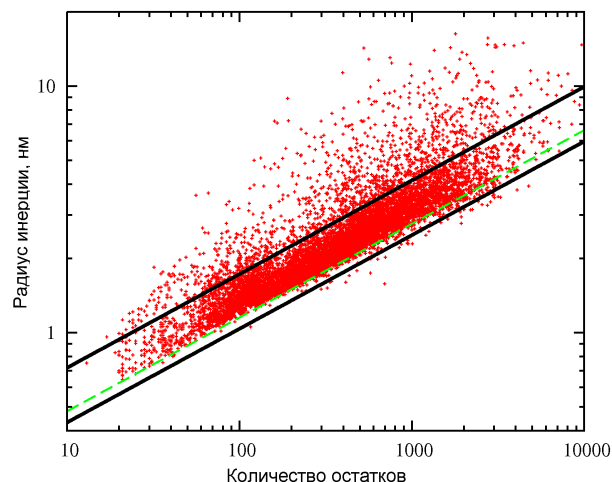
Кроме расчётов профилей энергии были проведены отдельные расчёты энергии гидратации молекул в объёмной ячейке с водой путём исключения взаимодействия между растворённой молекулой и молекулами воды. Расчёт свободной энергии проводился по методу Беннетта. Сравнение данных по гидратации, полученных в ходе двух типов расчётов, служило оценкой точности расчётов профилей свободной энергии.

Было предложено и апробировано два метода оценки энергии адсорбции: метод, основанный на подходе Гиббса, и путём измерения значения профиля энергии в минимуме. В подходе Гиббса сначала рассчитывался относительный профиль концентрации (предполагая концентрацию в газовой фазе равной 1 нм^{-3}). Затем рассчитывался избыток Гиббса, и энергия адсорбции оценивалась, предполагая толщину границы раздела равной 1 нм, поскольку это обычно была толщина, на которой варьировался профиль свободной энергии. Соответствующие теоретические основы данного метода были изложены в приложении В.

Численные оценки энергий гидратации сравнивались с известными экспериментальными данными и показали отличную корреляцию ($R=0.997$), однако абсолютные значения рассчитанных величин оказались систематически завышены на величину от 2 до 4 кДж/моль. Данные по энергии адсорбции сравнивались с единственными известными экспериментальными данными по адсорбции аминокислот, при этом коэффициент корреляции составил 0.65. Однако факт плохой корреляции сам по себе не свидетельствует о серьёзных систематических ошибках в результатах моделирования, поскольку энергии адсорбции аминокислот и их боковых цепей могут быть связаны нелинейно (тогда как такая линейность часто наблюдается при оценки энергий гидратации).

Четвёртая глава диссертации посвящена изучению распределения различных типов аминокислот между ядром и поверхностью глобулярных белков на основе расчёта поверхности, доступной растворителю, для большого количества экспериментальных пространственных структур белков. Результаты третьей главы опубликованы в работе [A2]. Для проведения статистического исследования был в полуавтоматическом режиме создан набор из 8 тысяч пространственных структур белков на основе базы данных PDB. Были отобраны белки с эволюционно-независимыми последовательностями аминокислот (сходство последовательностей оценивалось с помощью алгоритма BLAST) удовлетворяющие ряду условий: (I) наличие пространственных структур высокого разрешения, (II) отсутствие явного указания на неглобулярность белков в описании структур, (III) определённые соотношения между радиусом инерции и

Рис. 3. Каждая точка представляет одну белковую структуру в координатах радиус инерции - количество аминокислот в логарифмической шкале по обеим осям. Пунктирная линия - аппроксимация нижней границы облака точек. Структуры находящиеся между сплошными линиями были отобраны для дальнейшего рассмотрения.



длиной аминокислотной последовательности (см. Рис. 3).

Для всех отобранных белковых структур была рассчитана молекулярная поверхность, доступная растворителю, по алгоритму Ли-Ричардса, а также вычислены вклады каждой аминокислоты и её боковой цепи в поверхность белка. Величина доступной поверхности боковой цепи для каждого аминокислотного остатка в белке, отнесённая к таковой в модельном Ala-X-Ala трипептиде, определялась как *экспонированность* конкретного остатка и являлась базовой величиной для отнесения остатков к “поверхностным” или “ядерным”. Перед статистической обработкой данных был решён вопрос о зависимости получаемых средних распределений аминокислот от размера белковых глобул. Показано, что (см. Рис. 4) зависимости относительной встречаемости аминокислот выходят на постоянные значения для белков с размером больше 300 аминокислотных остатков (АКО). Такое поведение было объяснено мультидоменным строением глобулярных белков, а также требованиями к квазислучайности белковых последовательностей. В дальнейшем для вычисления статистических распределений использовались структуры размером более 300 АКО.

Чтобы охарактеризовать относительную вероятность для различных аминокислотных остатков иметь то или иное значение экспонированности, была введена величина статистической концентрации данного типа остатка при заданном уровне экспонированности, которая определялась как доля АКО заданного типа среди всех остатков с заданным уровнем экспонированности (см. ур. 1). Продолжая далее аналогию с термодинамикой многофазных систем,

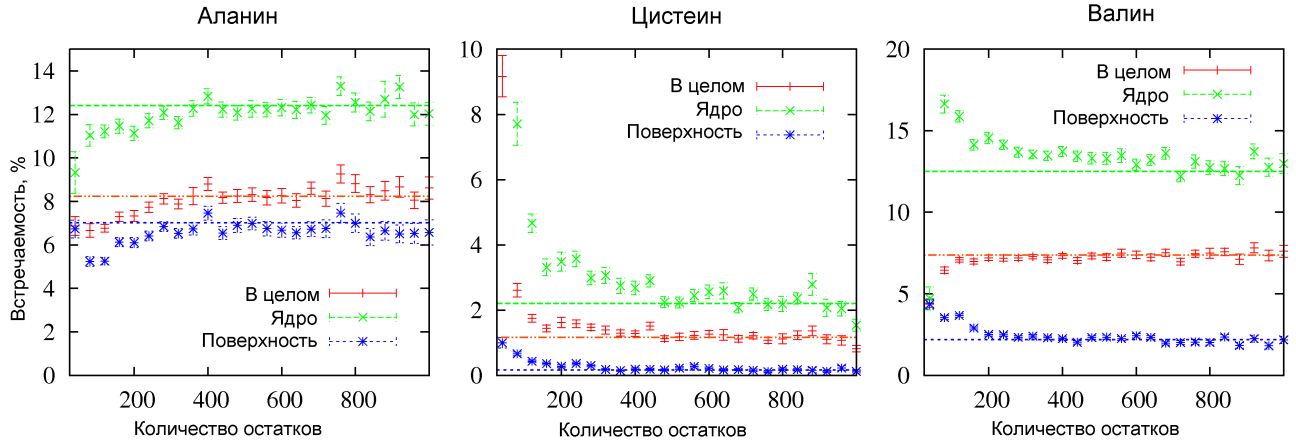


Рис. 4. Встречаемость некоторых аминокислот в белках различного размера, включая полную встречаемость, встречаемость на поверхности и встречаемость в ядре. Горизонтальные линии в каждом случае представляют встречаемость, усреднённую по всем белковым структурам с размером большим 300 АКО. Каждая точка представляет данные, усреднённые по окну шириной 40 АКО. Стандартные отклонения представлены вертикальными линиями.

группа всех АКО, которые удовлетворяют определённым критериям по экспонированности, была названа статистической (виртуальной) фазой, а логарифм отношения концентраций АКО в различных фазах – статистической энергией переноса АКО между различными виртуальными фазами (см. ур. 2).

$$c^a = \frac{N^a}{\sum^i N^i} \quad (1)$$

$$F_{transfer}^{stat} = -kT \ln \frac{c_1^a}{c_2^a} \quad (2)$$

где N^a это количество остатков типа a в статистической фазе, $F_{transfer}^{stat}$ – статистическая энергия переноса.

Такая аналогия по отношению к распределению АКО между ядром–поверхностью белка и динамическому распределению отдельных аминокислот (или соединений аналогов) между различными фазами в эксперименте (определяемое свободной энергией переноса вещества из одной фазы в другую) имеет теоретическое обоснование с точки зрения модели случайных энергий гетерополимерной глобулы [1] (о чём рассказывается в разделе 1.3.1 первой главы). Тот факт,

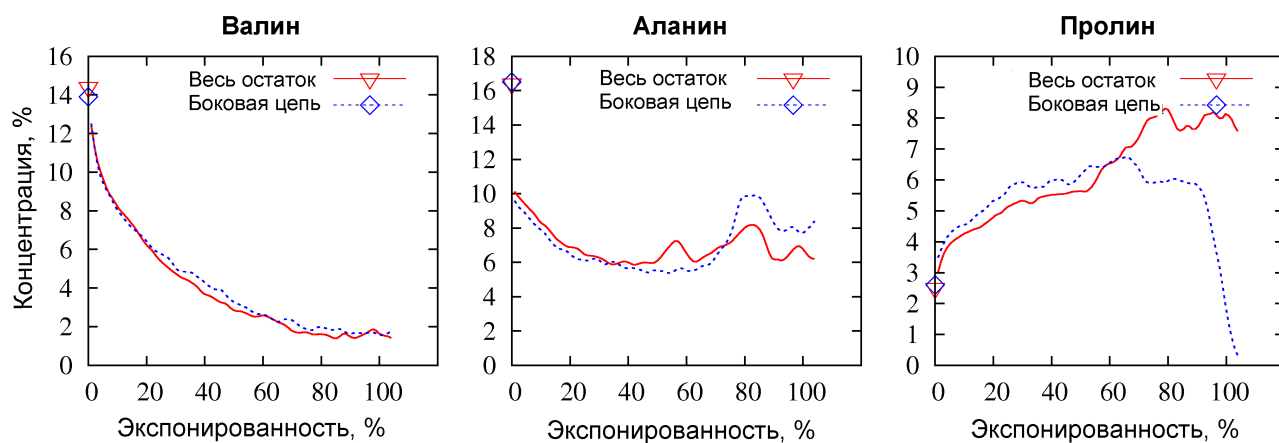


Рис. 5. Зависимость концентрации остатков в “статистической фазе” от экспонированности АКО для некоторых аминокислот. Точка в нуле соответствует данным по всем неэкспонированным остаткам.

что встречаемость структурных элементов в белках имеет квази-Больцмановскую статистику по отношению к “энергии” этого элемента, даёт нам право ставить вопрос о поиске корреляций между статистическими энергиями переноса АКО, вычисленными по уравнению 2, и экспериментально известными энергиями переноса аминокислот и их производных между различными несмешивающимися растворителями.

Для всех остатков были вычислены и построены зависимости относительной концентрации от степени экспонированности (см. пример на Рис. 5). Данные зависимости могут быть преобразованы в профили статистической свободной энергии различных АКО. Такие профили для всех аминокислот были проанализированы, сгруппированы по подобию и формам профилей, была дана соответствующая интерпретация, основанная на известных свойствах аминокислот и их боковых цепей.

Определение такого растворителя, чтобы энергии переноса аминокислот между водой и этим растворителем наилучшим образом коррелировали с наблюдаемым распределением аминокислот в белках, с одной стороны даёт фундаментальную информацию о свойствах и полярности внутренности белковой глобулы, а с другой определяет численные шкалы энергий погружения АКО в белковую глобулу, которые находят широкое применение в методах QSAR.

В то же время понятно, что расчёт корреляций может зависеть от критериев разделения АКО на поверхностные и ядерные. В большинстве предыдущих работ по смежной тематике данному факту не уделялось достаточного внимания, поэтому зачастую получались противоречивые результаты.

В данной работе было решено проанализировать сразу целое множество критериев подразделения АКО на поверхностные и ядерные, основанные на различных уровнях экспонированности боковых цепей аминокислот, и одновременно вычислить для них коэффициенты корреляции с несколькими экспериментальными шкалами, в частности, шкалами переноса аминокислот или подобных соединений между фазами вода/пар, вода/циклогексан, вода/октанол, октанол/циклогексан, а также шкалой энергий адсорбции на границу раздела вода/воздух. АКО считались находящимися в ядре глобулы, если экспонированность боковой цепи была равна 0 (отдельно также исследовался случай не нулевой экспонированности, но тем не менее близкой к нулю). Поверхностными считались АКО с экспонированностью в узком интервале около переменного значения X . Построенные графики зависимости коэффициентов корреляции от значения X и других критериев разделения подтвердили предположение о серьёзной зависимости коэффициента корреляции от критериев разделения остатков на поверхностные и ядерные. При этом было показано, что для различных экспериментальных шкал наилучшие значения корреляции достигаются при различных критериях.

По итогам анализа критериев классификации остатков было введено три шкалы статистических энергий переноса АКО из ядра белка (экспонированность 0) в виртуальные фазы с экспонированностями в пределах (I) 10-20%, (II) 50-60%, (III) 95-105%. Все шкалы отличались хорошо выраженной корреляцией лишь с одним из экспериментальных наборов данных. Так коэффициент корреляции для шкалы (I) с энергиями переноса вода/пар составлял 0.93, а с энергиями вода/октанол лишь 0.73, для шкалы (III) наблюдалась обратная картина – 0.57 против 0.93. Для выявления причин таких зависимостей были построены и проанализированы специальные двумерные диаграммы. Показано, что предложенные статистических шкалы отличаются по своей “чувствительности”. Шка-

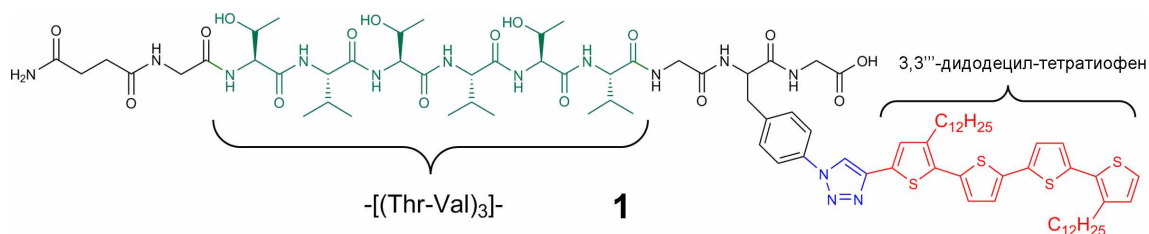


Рис. 6. Химическая формула изучаемого соединения.

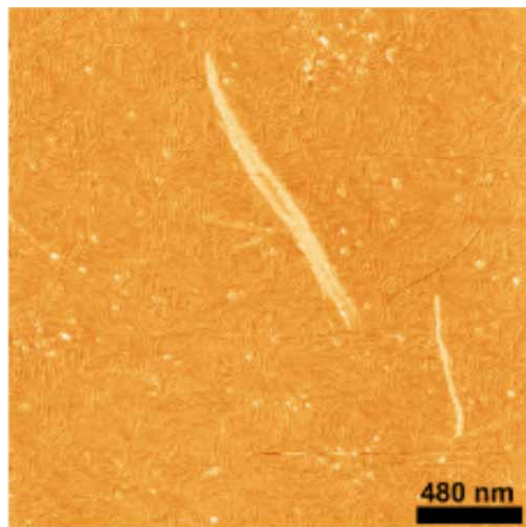
ла (i) ухватывает только грубые тенденции для АКО быть экспонированными или погружёнными в ядро, а шкалы (ii) и (iii) более чувствительны к особенностям строения и поведения остатков. Аналогичные утверждения можно сделать относительно экспериментальных шкал, с которыми наилучшим образом коррелируют статистические шкалы.

В последнем разделе главы приводятся соображения об особенностях строения белковых глобул, которые приводят к отклонению корреляций от идеальных. Обсуждается роль конформационных вкладов, специфических взаимодействий, функциональных ограничений и т.д.

В пятой главе излагаются результаты работы по атомистическому моделированию нанофибрилл из молекул гибридов олиготиофена и олигопептида $[\text{Thr-Val}]_3$ (Рис. 6). Результаты данного раздела работы отражены в статье [A3]. Соединение **1** (модифицированное ПЭГ) было синтезировано и исследовано в группе профессора Бауэрли (Ульм, Германия)[2]. Было показано, что молекулы соединения **1** способны самособираться в нанофибриллы толщиной 6-8 нм, длиной 100-300 нм, которые в свою очередь формируют волокнистые агрегаты больших размеров (см. Рис. 7).

Задачей данной работы являлось предсказание различных упаковок молекул в фибриллярные агрегаты, на основе имеющихся экспериментальных данных, оценка стабильности и характеристик получаемых фибрилл методом молекулярной динамики, выработка наиболее удовлетворительной модели. Для создания молекулярных структур фибрилл был использован подход рационального иерархического конструирования с применением методов молекулярной динамики и молекулярной механики. Суть данного подхода состоит в последовательном конструировании молекулярных агрегатов с пошаговой оптимиза-

Рис. 7. Изображение фибрилл на подложке, формируемых соединением **1**, полученное методом атомно-силовой микроскопии после осаждения фибрилл из раствора (50% метанол:50% дихлорметан) на слюду методом spin-coating [2].



цией структуры на основе представлений об иерархии взаимодействий присутствующих в таких системах и использовании экспериментальных данных при дизайне агрегатов. Проанализировав литературные данные и приняв во внимание данные ИР-спектроскопии, указывающие на формирование бета-слоёв в растворе вещества **1**, за основу построения агрегатов была принята организация пептидных сегментов в периодический параллельный или антипараллельный бета-слой.

Была создана периодическая ячейка из двух молекул, образующих бета-слой, с периодом 4.8 \AA на один бета-лист и затем молекулы были оптимизированы в периодической ячейке методами молекулярной механики и динамики (см. Рис. 8). Данные периодические ячейки послужили кирпичиками для построения длинных однослойных фибрилл.

На основе однослойных упаковок были созданы различные двуслойные упаковки из 4 молекул в периодической ячейке. Всего было проанализировано 5 различных вероятных укладок. Данные упаковки могут быть различных типов в зависимости от того, какими сторонами и в каком направлении соединены слои (см. Рис. 9). Двуслойные агрегаты были отрелаксированы методом молекулярной динамики, чтобы боковые цепи аминокислот нашли положение соответствующее минимуму свободной энергии. Для всех различных двуслойных укладок была вычислена энтальпия образования. На основании этих данных и рационального анализа были отобраны две укладки ((II) и (III)) для

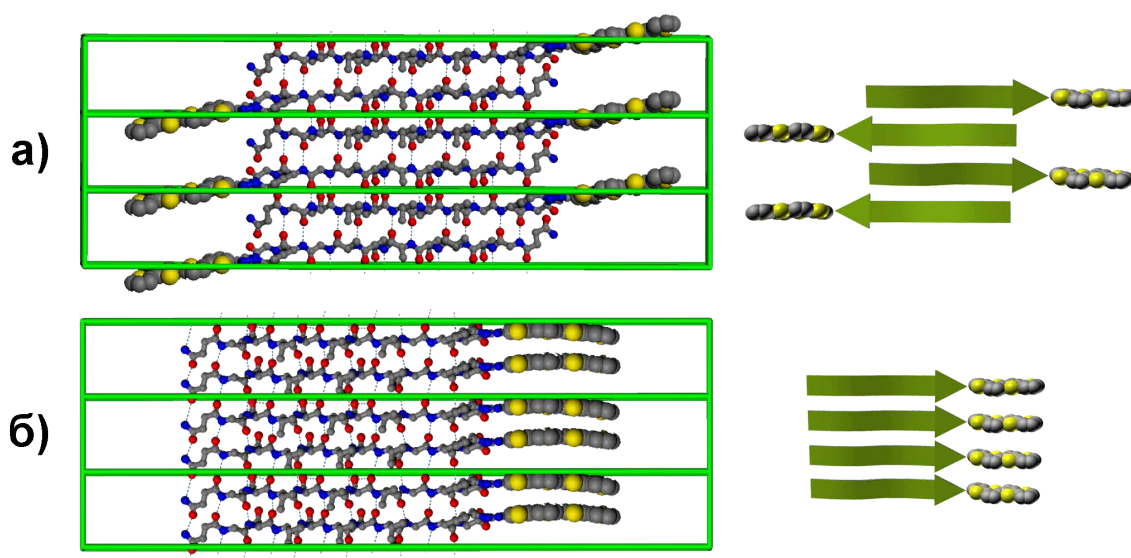


Рис. 8. Схематическое изображение упаковок для однослойных фибрилл (справа) и соответствующие им периодические ячейки из двух молекул (слева): а) вариант антипараллельной упаковки пептидных частей, б) вариант параллельной упаковки пептидных частей.

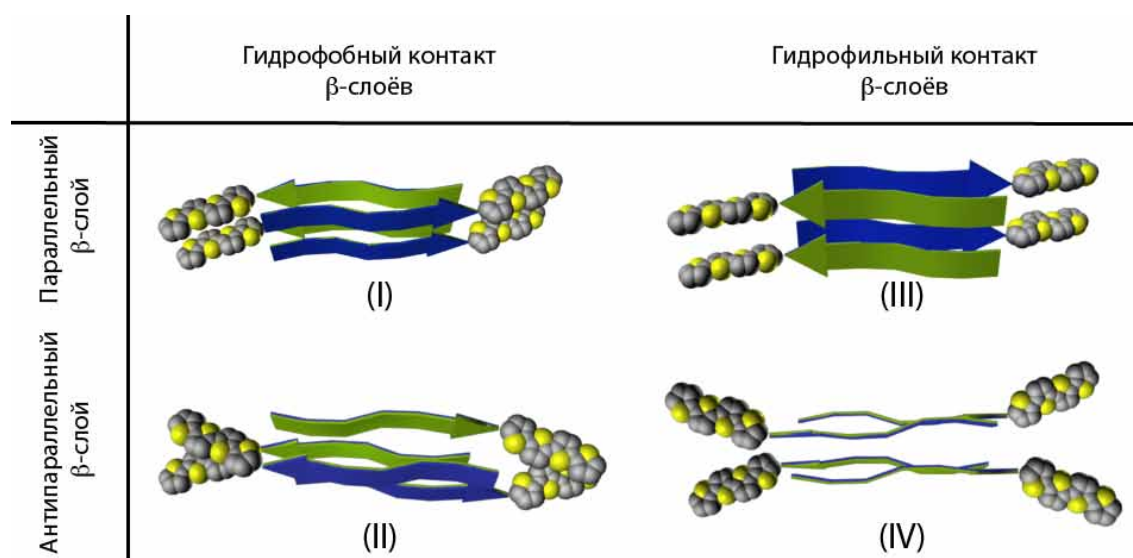


Рис. 9. Схематическое изображение возможных упаковок двуслойных фибрилл.

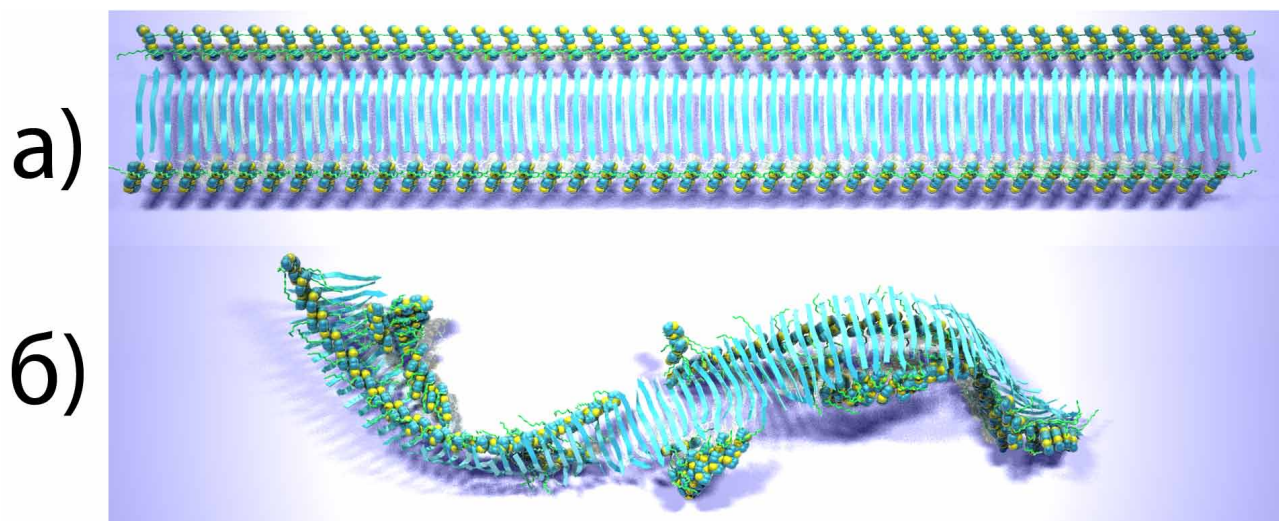


Рис. 10. Пример мгновенных изображений для однослойного волокна, основанного на *анти-параллельном* бета-слое, в ходе расчётов молекулярной динамики: а) начальная конформация, б) система через 10 нс моделирования.

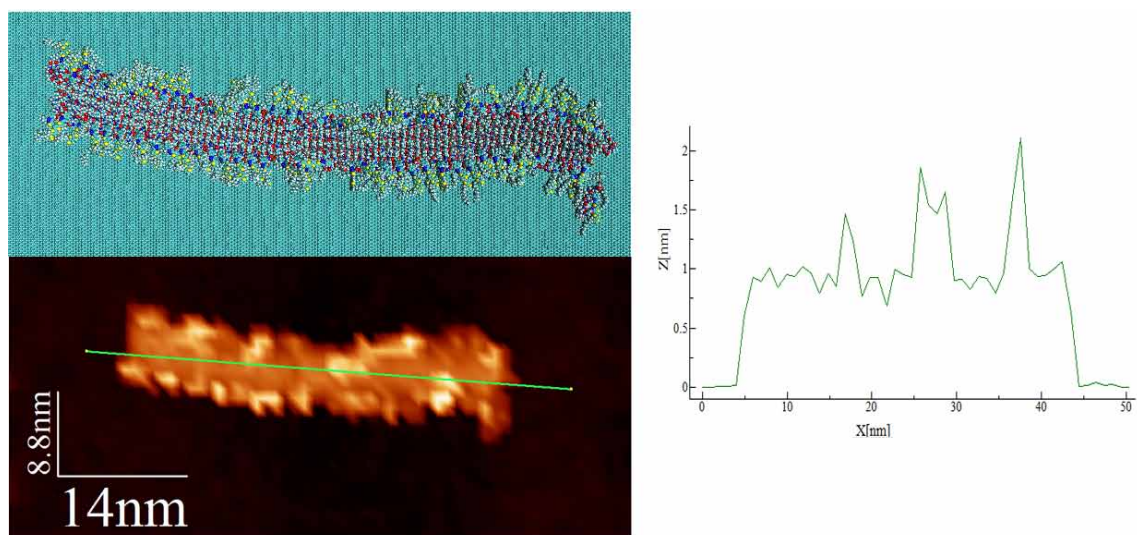


Рис. 11. Модель АСМ изображения для молекулярной системы - однослойный антипараллельный фибриллярный агрегат на графите, профиль высоты вдоль модели АСМ изображения.

дальнейшего исследования.

Из полученных периодических упаковок были сконструированы однослойные и двуслойные агрегаты длиной в 80 бета-нитей (ок. 40 нм). Для таких систем был проведён расчёт методом молекулярной динамики в программном пакете LAMMPS на основе силового поля PCFF. Расчёты проводились в параллельном режиме на 64 процессорах на суперкомпьютере СКИФ-МГУ. Длина траекторий составляла 10 нс с шагом в 1 фс. По результатам моделирования был проведён визуальный анализ геометрии фибрилл (см. Рис. 10), а также проведены статистические обработки: проанализирован состав вторичной структуры пептидных сегментов, построены гистограммы расстояний для пептидных и тиофеновых сегментов, проведён анализ взаиморасположения тиофеновых колец и проанализированы возможности для $\pi - \pi$ -стэкинга тиофенов.

Было также проведено моделирование однослойной фибриллы на графитовой подложке и предложен алгоритм виртуальной атомносиловой микроскопии, который позволил по имеющейся атомной структуре построить подобие изображения, получаемого атомносиловым микроскопом, и построить профили высоты для фибриллярных агрегатов (см. Рис.11). Высота однослойных агрегатов была оценена в 9 Å, что оказалось в хорошем соответствии с высотами агрегатов регистрируемых АСМ в эксперименте.

По результатам анализа для фибрилл различного типа были сделаны следующие выводы. Для молекул **1** агрегация пептидных частей в бета-слой и стэкинг тиофеновых сегментов являются конкурирующими мотивами укладки в силу различного периода, навязываемого данными взаимодействиями (ок. 5 Å –период бета-слоя против ок. 3.5 Å– расстояние $\pi - \pi$ -стэкинга). Фибриллы основаны на укладке пептидов в бета-слой, что навязывает соответствующую периодичность тиофеновым сегментам и препятствует их $\pi - \pi$ -стэкингу. Однослойные фибриллы на основе антипараллельной укладки в объёме склонны к образованию суперспирали. Двуслойные агрегаты намного более стабильны и прямолинейны. Двуслойные агрегаты на основе антипараллельной укладки склонны к закручиванию плоскости фибриллы относительно оси (твист) порядка 180° на 80 нм.

На основе обобщения данных моделирования, а также экспериментальных данных, включающих АСМ, ПЭМ, ИР-, КД-, флюоресцентную спектроскопии была определена наиболее вероятная модель наблюдаемых фибрилл, основанная на однослойных фибриллах с упаковкой пептидных сегментов в параллельный бета-лист.

В **заключении** перечислены основные результаты и выводы диссертации.

Диссертация содержит 4 главы приложений (А, Б, В, Г). В **приложении А** приводится список и химические формулы всех аминокислот и соединений аналогов их боковых групп. В **приложении Б** приведён вывод формулы для вычисления свободной энергии сольватации в компьютерном моделировании. Показывается, что работа (свободная энергия) по выключению взаимодействий между молекулой и растворителем с точностью до незначительных поправок равна энергии сольватации определяемой в эксперименте через отношение концентраций вещества в газе и в растворе. В **приложении В** приводятся вспомогательные формулы к главе три. В **приложении Г** размещены профили свободной энергии для всех веществ, изученных в главе три.

Основные результаты и выводы диссертации

1. Методами молекулярной динамики изучена гидратация боковых цепей аминокислот вблизи поверхности воды. Построены профили свободной энергии молекул вблизи поверхности воды. Показано, что профили свободной энергии для всех молекул имеют схожую форму. Показано, что свободная энергия гидратации достигает своего объёмного значения при погружении молекул на глубину 0.6-0.7 нм, где влияние поверхностных эффектов исчезает. Разработан метод оценки свободной энергии адсорбции молекул на границу раздела жидких фаз на основе классических полноатомных моделей молекул. Проведена оценка энергий гидратации и адсорбции на границу раздела вода/воздух для боковых цепей аминокислот.
2. Исследовано распределение аминокислотных остатков в глобулярных бел-

ках в зависимости от их погружённости в структуру белка путём статистического анализа большого количества экспериментальных данных по пространственному строению эволюционно-независимых белков. Получены статистические профили свободной энергии различных типов аминокислотных остатков в зависимости от экспонированности. С помощью различных методов классификации аминокислот на “ядерные” и “поверхностные” рассчитаны статистические энергии переноса аминокислот из ядра на поверхность, рассчитаны корреляции этих статистических энергий с экспериментальными коэффициентами распределения аминокислот между рядом растворителей. Показано, что коэффициенты корреляции сильно зависят как от выбора пар растворителей, так и от выбора критериев статистической классификации аминокислот. Предложены три различных статистических шкалы, каждая из которых наилучшим образом коррелирует с одной из экспериментальных шкал гидрофобности (вода/пар, вода/октанол, вода/циклогексан). Проанализированы причины такого поведения.

3. Предложены различные возможные модели укладки гибридных молекул тетратиофентиофен-олигопептид ($[\text{Thr-Val}]_3$) с образованием нанофибрилл. Созданы молекулярные модели таких укладок путём поэтапного рационального конструирования с учётом имеющихся экспериментальных данных. Созданные нанофибриллы проанализированы методом молекулярной динамики. Показано, что изучаемые молекулы могут формировать стабильные, упорядоченные фибрилло-подобные молекулярные слои благодаря организации пептидных частей молекулы в параллельный или антипараллельный бета-слой. Показано, что однослойные структуры в объёме обладают тенденцией к образованию суперспирали. Двуслойные структуры, в отличие от однослойных, в объёме сохраняют свою линейность и, в зависимости от типа укладки, могут обладать закрученностью. Предложены различные варианты однослойных и двуслойных агрегатов, в котором тиофеновые сегменты двух слоёв (лент) образуют структуры, подобные нанопроводам, с возможной электропроводностью. Показано, что

наиболее вероятной упаковкой молекул в фибриллах, наблюдаемых в эксперименте, является упаковка, основанная на параллельном бета-слое.

Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации

- A1. Shaytan A. K., Ivanov V. A., Shaitan K. V., Khokhlov A. R. Free energy profiles of amino acid side chain analogs near water-vapor interface obtained via MD simulations // Journal of Computational Chemistry. 2010. Vol. 31, no. 1. Pp. 204–216.
- A2. Shaytan A. K., Shaitan K. V., Khokhlov A. R. Solvent Accessible Surface Area of Amino Acid Residues in Globular Proteins: Correlation of Apparent Transfer Free Energies with Experimental Hydrophobicity Scales // Biomacromolecules. 2009. Vol. 10, no. 5. Pp. 1224–1237.
- A3. Shaytan A. K., Khokhlov A. R., Khalatur P. G. Large-scale atomistic simulation of a nanosized fibril formed by thiophene-peptide “molecular chimeras” // опубликовано электронно // Soft Matter. 2010. URL: <http://dx.doi.org/10.1039/b918562c>.
- A4. Шайтан К. В., Турлей Е. В., Шайтан А. К. и др. Динамический молекулярный дизайн био- и наноструктур // Российский Химический Журнал. 2006. Т. L, № 2. С. 53–65.
- A5. Шайтан К. В., Турлей Е. В., Шайтан А. К. и др. Неравновесная молекулярная динамика наноструктур, включая биологические // Химическая Физика. 2006. Т. 25, № 9. С. 31–48.
- A6. Шайтан К. В., Турлей Е. В., Шайтан А. К. и др. Молекулярная динамика и дизайн био- и наноструктур // Вестник биотехнологии. 2005. Т. 1. С. 66–78.

- A7. Shaytan A. K., Ivanov V. A., Khokhlov A. R. Peptide dynamics at water-membrane interface // The Fifth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Ed. by N. Kolchanov, R. Hofstad. Vol. 1. Novosibirsk, Russia: Institute of Cytology and Genetics, 2006. Pp. 320–323.
- A8. Шайтан А. К., Халатур П. Г., Хохлов А. Р. Суперкомпьютерное конструирование биоорганических нанопроводов // Суперкомпьютерные технологии в науке, образовании и промышленности, Под ред. В. А. Садовничий, Г. И. Савин, В. В. Воеводин. Москва: Издательство Московского университета, 2009. С. 51–56.
- A9. Шайтан А. К. Динамика аминокислотных остатков на интерфейсе вода-мембрана // Сборник тезисов, VIII Конференция студентов и аспирантов Учебно-научный центр по химии и физике полимеров и тонких органических плёнок, Моск. Обл., Россия. 2004. С. 84.
- A10. Шайтан А. К. Динамика аминокислотных остатков на интерфейсе вода-мембрана // Сборник тезисов, Системная биология и Биоинженерия: международная школа-конференция молодых учёных, Моск. Обл., Россия. 2005. С. 72.
- A11. Шайтан А. К. Динамика аминокислотных остатков на интерфейсе вода-гексан // Сборник тезисов, Малый полимерный конгресс, Москва, Россия. 2005. С. 136.
- A12. Шайтан А. К., Иванов В. А., Хохлов А. Р. Определение свободной энергии гидратации боковых цепей аминокислот с использованием явной модели воды // Сборник тезисов, Четвёртая Всероссийская Каргинская Конференция "Наука о полимерах 21-му веку Москва, Россия. Т. 3. 2007. С. 364.
- A13. Shaytan A. K., Khokhlov A. R., Ivanov V. A. MD Simulations of Liquid-Liquid Interface of Aminoacid Solutions // Сборник тезисов, Европейский Полимерный Конгресс 2005, Москва, Россия. 2005. Р. 212.

- A14. Shaytan A. K., Khokhlov A. R. Conformational Statistics of Amino Acids in Proteins based on their Solvent Accessible Surface Area // Book of Abstracts, 3rd STIPOMAT Conference, Les Diablerets, Switzerland. 2007.
- A15. Shaytan A. K., Khokhlov A. R. Conformational Statistics of Globular Proteins with Respect to Hydrophobicity/Interfacial Activity of Amino Acid Residues // Book of Abstracts, The second Saint-Petersburg International Conference on NanoBioTechnologies “NanoBio’08”, Санкт-Петербург, Россия. 2008. P. 117.
- A16. Shaytan A. K. Selfassembly Simulations of Bioinspired Hybrid Systems Based on Oligothiophenes and Peptides // Сборник тезисов, Первая международная летняя школа - Нано2009. Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах, Моск. Обл., Россия. 2007.

Цитированные источники

1. Finkelstein A. V., Badretdinov A. Y., Gutin A. M. Why do protein architectures have boltzmann-like statistics? // Proteins: Struct., Funct., Genet. 1995. Vol. 23, no. 2. Pp. 142–150.
2. Schillinger E.-K., Mena-Osteritz E., Bäuerle P. Синтез диблок олигомера из алкилированного тетрадиофена и пептидной последовательности [Thr-Val]₃ // не опубликовано.