ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА, 2014, том 33, № 7, с. 1–10

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА
БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ЛИГАНДОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ НА СВОЙСТВА БЕЛКА ЛИЗОЦИМА

© 2014 г. К. Б. Терешкина, А. С. Степанов, Д. О. Синицын, Ю. Ф. Крупянский*

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва

**E-mail: yufk@chph.ras.ru*

Поступила в редакцию 24.12.2013

В настоящей работе экспериментальными и теоретическими методами исследована структура комплексов алкилированных оксибензолов – 4-гексилрезорцина, 5-метилрезорцина и тирозола. Изучено влияние 4-гексилрезорцина и 5-метилрезорцина в большом диапазоне их концентраций на структуру, равновесные флуктуации и функциональную активность водорастворимого фермента лизоцима. Построена пространственная модель взаимодействия молекул лигандов и их кластеров с белком и водным окружением. Предложен возможный механизм стабилизации третичной структуры белка указанными молекулами.

Ключевые слова: 5-метилрезорцин, 4-гексилрезорцин, тирозол, малые лиганды, стабилизация белков, химические шапероны.

DOI: 10.7868/S0207401X14070139

1. ВВЕДЕНИЕ

Работа посвящена проблеме изучения механизма стабилизации белковой глобулы малыми лигандами, называемыми химическими шаперонами (ХШ) [1, 2]. Подобные задачи возникают и при изучении самоорганизации (сворачивания) полипептидной цепи в нативную структуру. Известно множество заболеваний, сопряженных с неправильным сворачиванием белковых глобул, таких как прионные болезни, болезни Альцгеймера, Паркинсона, рак, диабет и др. [3–5]. Существуют многочисленные научные данные по стабилизации белков и пептидов химическими шаперонами, самыми известными из которых являются криопротектор глицерин и некоторые другие полиолы, осмопротектор триметиламин-N-оксид (ТМАО), диметилсульфоксид (ДМСО), некоторые аминокислоты (глицин, бетаин) и сахара (например, трехалоза) [1, 6, 7].

Алкилрезорцины входят в группу алкилоксибензолов – биологически активных веществ микробного и растительного происхождения, встречающихся у бактерий, грибов, лишайников, растений [8]. Так, 5-метилрезорцин (орцинол) в природе встречается у многих видов лишайников. Орцинол находит свое биологическое применение в составе веществ, обладающих антиоксидантной и антибактериальной активностью [9]. Изучение алкилоксибензолов представляет собой актуальную научную задачу в связи с тем, что эти соединения обладают широким спектром действия как на клетки биологических организмов, так и на отдельные белковые молекулы [8, 10]. Они находят применение в биотехнологии для стабилизации и активации гидролитических ферментов, в частности лизоцима [11–13], а также в химической промышленности – при производстве резины.

В настоящей работе рассмотрен ряд алкилированных оксибензолов, которые, как предполагается, могут быть отнесены к классу химических шаперонов [14–16]. Ранее авторами изучалась проблема влияния алкилоксибензолов на структурно-динамические особенности белков [11, 12]. В настоящей работе обсуждается новый подход к проблеме стабилизации белковых глобул и функционированию белка-фермента, основанный на образовании кластеров малых лигандов и их гидратов при осуществлении механизмов стабилизации белков. Определены основные сайты связывания 5-метилрезорцина на поверхности лизоцима.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Изучение изменений структуры белка

Изменение структуры лизоцима при взаимодействии с химическим шаперонами при различных концентрациях изучалось методом диффузного рассеяния рентгеновских лучей (ДРРЛ). Более подробная информация о методе изложена в работах [17, 18]). Используемая в работе установка по диффузному рассеянию рентгеновских лу-

чей позволяла снимать индикатрисы рассеяния в интервале углов от 3 до 80°. Нахождение функции радиального распределения атомов с помощью интегрального фурье-преобразования данных интенсивности ДРРЛ в данной работе проводилось в одноатомном (моноатомном) приближении [18]. Это приближение дает весьма хорошие результаты и позволяет улавливать слабые изменения структуры (около 0.1 Å) [18], что практически невозможно сделать с помощью обычного рентгеноструктурного анализа кристаллизованных белков. Напомним, как определяется сферически-симметричная функция распределения расстояний между атомами $\rho(r)$ [19–23]. Функция $\rho(r)$ определяется так, что величина $4\pi r^2\rho(r)dr$ есть среднее число атомов, находящихся на расстояниях между r и $r + dr$ от центра отмеченного атома.

Диффузное рассеяние рентгеновских лучей на малых углах весьма чувствительно к изменению формы макромолекулы и ее радиуса гирации при внешних воздействиях [24, 25]. Поэтому увеличение свободного объема в глобуле белка (или увеличение радиуса гирации) достаточно легко проверить с помощью малоуглового рассеяния рентгеновских лучей. Этот факт использовался нами ниже при обсуждении результатов.

Изменение равновесных флуктуаций атомов в лизоциме при взаимодействии его с ХШ изучалось методом упругого рэлеевского рассеяния мессбауэровского излучения (РРМИ). Этот метод изучения флуктуаций в белках играет заметную роль среди современных физических методов [26]. Он представляет собой комбинацию диффузного рентгеновского рассеяния и мессбауэровской спектроскопии и обладает рекордным энергетическим разрешением, равным разрешению мессбауэровской спектроскопии. Изучение динамики белков в данной работе проводилось вышеописанным методом с использованием мягких условий коллимации. Ширина функции углового распределения составляет 8 град. В этом варианте нами уже изучалась доля упругого рассеяния для различных белков и спектры РРМИ [27–31]. Мягкие условия коллимации позволяют значительно увеличить скорость счета (набираемую статистику) и использовать при интерпретации экспериментальных данных так называемое “некогерентное” приближение. В этом случае интенсивность рэлеевски (упруго) рассеянных γ-квантов на увлажненном и окруженном ХШ белке можно с точностью до 20–30% [27–31] полагать равной сумме интенсивностей γ-квантов, рассеянных на молекулах белка, молекулах растворителя и молекулах ХШ. Тогда суммарная измеряемая доля упругого рассеяния f_Σ является аддитивной составляющей долей упругого рассеяния отдельных компонент: f_p, f_w *и* f_s (Подробнее см. оригинальные статьи [27–31]). Суммарная измеряемая доля упругого рассеяния f_Σ нам известна, поведение упругой доли для гидратной воды нам известно достаточно хорошо (см. оригинальные работы и обзоры по динамике гидратной воды [28, 30–35]). В результате доля упругого рассеяния для лизоцима, окруженного, например, молекулами метилрезорцина, f_p, существенно зависит от доли упругого рассеяния для метилрезорцина, f_s. Оказалось, что непосредственные измерения зависимости доли упругого рассеяния метилрезорцина от степени его гидратации мало подходят для изучения поведения f_p в тройной системе белок–гидратная вода – лиганд. Поэтому динамические свойства метилрезорцина моделировались с учетом его сильной вращательной диффузии при степени гидратации лизоцима $h = 1$. Учет вращательной диффузии химических шаперонов вносит дополнительную большую ошибку в определение амплитуды среднеквадратичных смещений собственно белка. Кроме этого, сама глобула лизоцима при столь сильной степени гидратации $h = 1$, существенно большей 0.6, при которой можно было пренебрегать движением глобулы как целого [27–31], может начать участвовать в либрационных движениях, амплитуду и время корреляции которых оценить крайне трудно. Данные движения дополнительно увеличивают ошибку определения амплитуды внутриглобулярных среднеквадратичных смещений собственно белка, которую авторы оценивают в 50–60% от величины амплитуды.

2.2. Изучение конформационной лабильности систем белок–вода–малые лиганды, а также кластеров и гидратов малых лигандов

Для определения конформационных изменений в системах, содержащих лизоцим и малые лиганды в различных концентрациях, был использован классический метод молекулярной динамики [33–35]. При изучении структуры кластеров и гидратов алкилоксибензолов и разработке силовых полей этих систем были использованы методы квантовой механики.

Молекулярно-динамическое моделирование орцинолсодержащих систем проводилось в программном комплексе GROMACS [36] методом классической молекулярной динамики. Использовалось полноатомное силовое поле OPLS-AA. Шаг интегрирования составлял 1–2 фс. “Длина” траекторий составляла 30–100 нс для разных концентраций 5-метилрезорцина.

Параметры силового поля для 5-метилрезорцина определялись с помощью расчетов *ab initio* в программном комплексе FIREFLY (называемый ранее PC GAMESS) [37]. Расчеты проводились методом Хартри–Фока. Для аппроксимации электростатического потенциала с целью нахождения парциальных атомных зарядов ис-

пользовался расширенный базисный набор, содержащий поляризационные и диффузные функции, 6-311++G(*d*,*p*), был использован алгоритм поиска электростатического потенциала GEODESIC. Необходимые внутри- и межмолекулярные константы находились с использованием наборов базисных функций 6-311G(*d*,*p*) и 6-31G(*d*). Далее проводили процедуру усреднения зарядов для симметричных атомов и их параметризацию для силового поля OPLS-AA. Для сравнения результатов наших расчетов с расчетами параметров известных малых лигандов, значения параметров для триметиламин оксида (TMAO) и мочевины брались из работы [38].

Были изучены системы, содержащие различное количество молекул 5-метилрезорцина на кубическую ячейку с ребром 7.1 нм. В центр ячейки помещалась молекула лизоцима (PDB ID 1AKI [39], 3HTB [40]), вокруг нее в случайном порядке – молекулы 5-метилрезорцина, далее ячейка заполнялась водой. Были исследованы системы, содержащие от 1 до 880 молекул 5-метилрезорцина. В качестве контроля были рассчитаны системы, состоящие из лизоцима и воды и из 5-метилрезорцина и воды, а также системы, содержащие лизоцим, TMAO или мочевину и воду. Использовались модели воды TIP3P и TIP4P. Проводились оптимизация энергии систем и начальная релаксация в течение 200 пс в NVT- и NPT-ансамблях.

Отдельно рассчитывались системы, состоящие из нескольких молекул 5-метилрезорцина, 4-гексилрезорцина и тирозола, а также гидраты этих соединений. Для оценки стабильности полученных соединений использовался метод из работы [41].

3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИЗОЦИМА С МАЛЫМИ ЛИГАНДАМИ

Вторичная структура лизоцима содержит шесть α-спиралей и три β-листа. Их пространственное расположение таково, что на поверхности выступают лишь малые части гидрофобных областей белка. Соответственно, основными сайтами связывания малых лигандов могут служить боковые радикалы гидрофильных аминокислотных остатков, непосредственно или опосредованно через сеть молекул воды, образующих водородные связи с гидроксильными группами 5-метилрезорцина, 4-гексилрезорцина или тирозола. Интересно пространственное распределение молекул алкилоксибензолов относительно белковой глобулы. Ранее было сделано предположение о возможном наличии стекинг-взаимодействий между молекулами лигандов, приводящих к стабилизации лизоцима [11].

3.1. Взаимодействие лизоцима с гексилрезорцином

Методом ДРРЛ изучено изменение структуры лизоцима при взаимодействии с гексилрезорцином при различных его концентрациях. Три α-спирали в лизоциме можно расположить на ребрах полиэдра [42]. Нативный лизоцим имеет два пика: при $Q = 0.6$ и 0.34 Å^{-1}, соответствующих характеристическим расстояниям $d \sim 11$ и ~18.5 Å между областями с повышенной электронной плотностью в макромолекуле белка (α-спиралям). Используемая в работе установка по диффузному рассеянию рентгеновских лучей позволяет снимать индикатрисы рассеяния в интервале от 3 до 80°, т.е. пики, лежащие при разрешении в 20 Å, целиком не наблюдаются. Однако можно достаточно хорошо следить за изменением интенсивности и формы пика для $d \sim 11$ Å и перехода его в пик для $d \sim 18.5$ Å при действии на лизоцим как гидратной воды [17], так и малых лигандов.

Сравнение функций радиального распределения, полученных методом фурье-анализа интенсивностей ДРРЛ [17] для чистого лизоцима и лизоцима, окруженного 40 молекулами гексилрезорцина на глобулу (см. рис. 1*а*), дает возможность сделать вывод, что вторые и третьи пики функции радиального распределения для чистого лизоцима и лизоцима, окруженного 40 молекулами гексилрезорцина, практически совпадают. Четвертый, пятый и шестой пики для лизоцима, окруженного 40 молекулами гексилрезорцина, смещаются вправо по отношению к этим же пикам для чистого лизоцима, что свидетельствует о появлении дополнительного свободного объема в глобуле белка и небольшом увеличении радиуса гирации R_g макромолекулы при данной концентрации гексилрезорцина.

3.2. Взаимодействие лизоцима с метилрезорцином

По данным молекулярной динамики (рис. 1*б*) видно, что при добавлении любого молекулярного объекта, занимающего значительный объем (например, молекулы белка), в водное окружение структура воды становится более упорядоченной (происходит сдвиг первого пика функции радиального распределения атомов кислорода молекул воды в левую сторону). Сравнение высот первого пика относительно системы лизоцим–вода показывает, что присутствие TMAO и 5-метилрезорцина приводит к увеличению высоты пика, в то время как присутствие мочевины – к некоторому уменьшению высоты. При этом присутствие молекул TMAO в ячейке упорядочивает пространственное распределение молекул воды. Для 5-метилрезорцина этот эффект выражен слабее, для мочевины он почти не заметен (или отсутствует). Однако в целом можно говорить об упо-

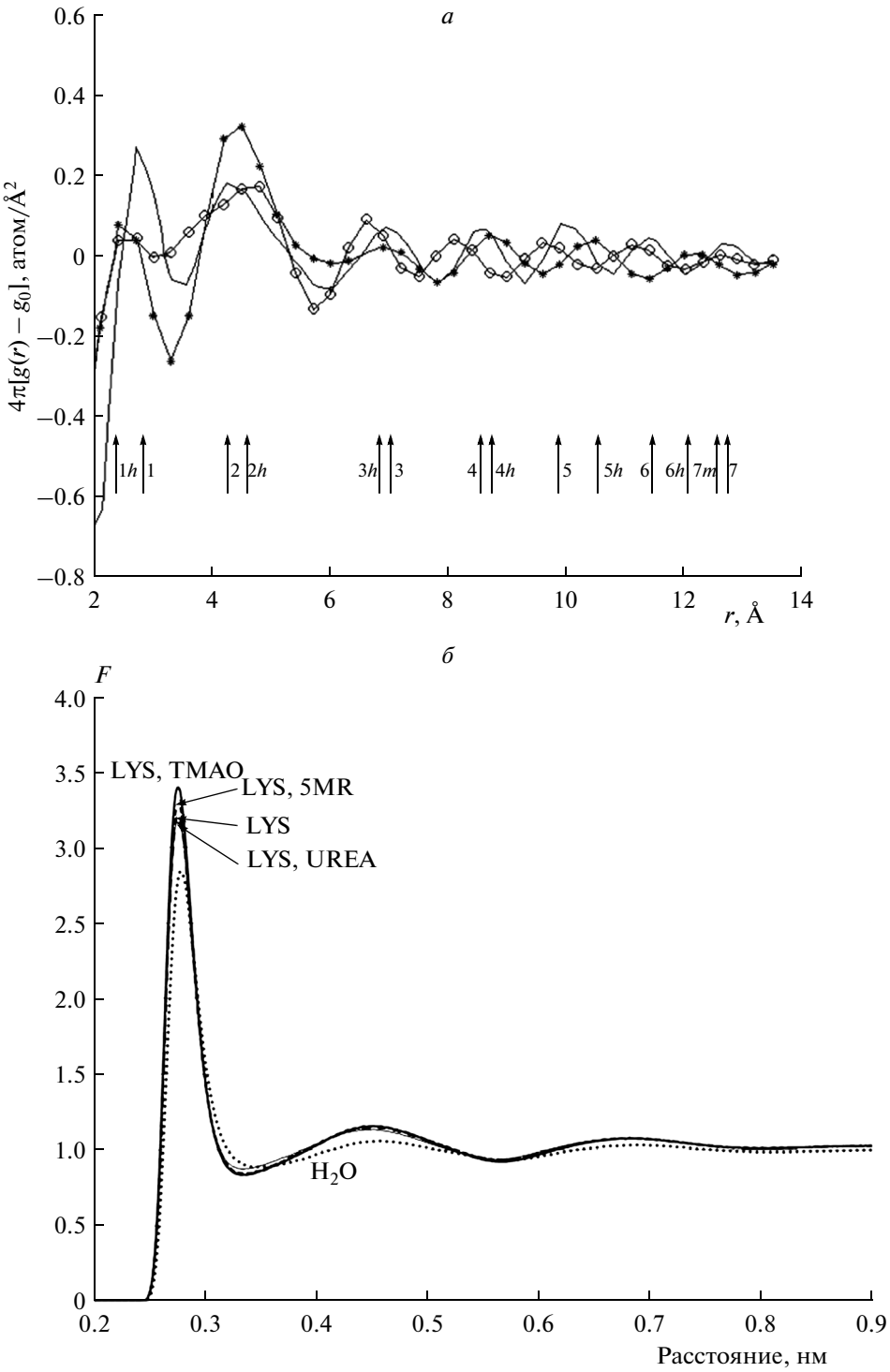


Рис. 1. *а* – Функции радиального распределения для чистого гидратированного лизоцима (сплошные кривые); для лизоцима, окруженного 40 молекулами гексилрезорцина (*); и для лизоцима, окруженного 10 молекулами метилрезорцина (○). Стрелками указаны положения пиков на функции радиального распределения для системы с 40 молекулами гексилрезорцина (*h*) и для системы с 10 молекулами метилрезорцина (*m*). *б* – Функции радиального распределения атомов кислорода воды в системах: чистая вода (H_2O), лизоцим (LYS), лизоцим с 5-метилрезорцином (LYS, 5MR), лизоцим с TMAO (LYS, TMAO), лизоцим с мочевиной (LYS, UREA), полученные путем расчетов молекулярной динамики.

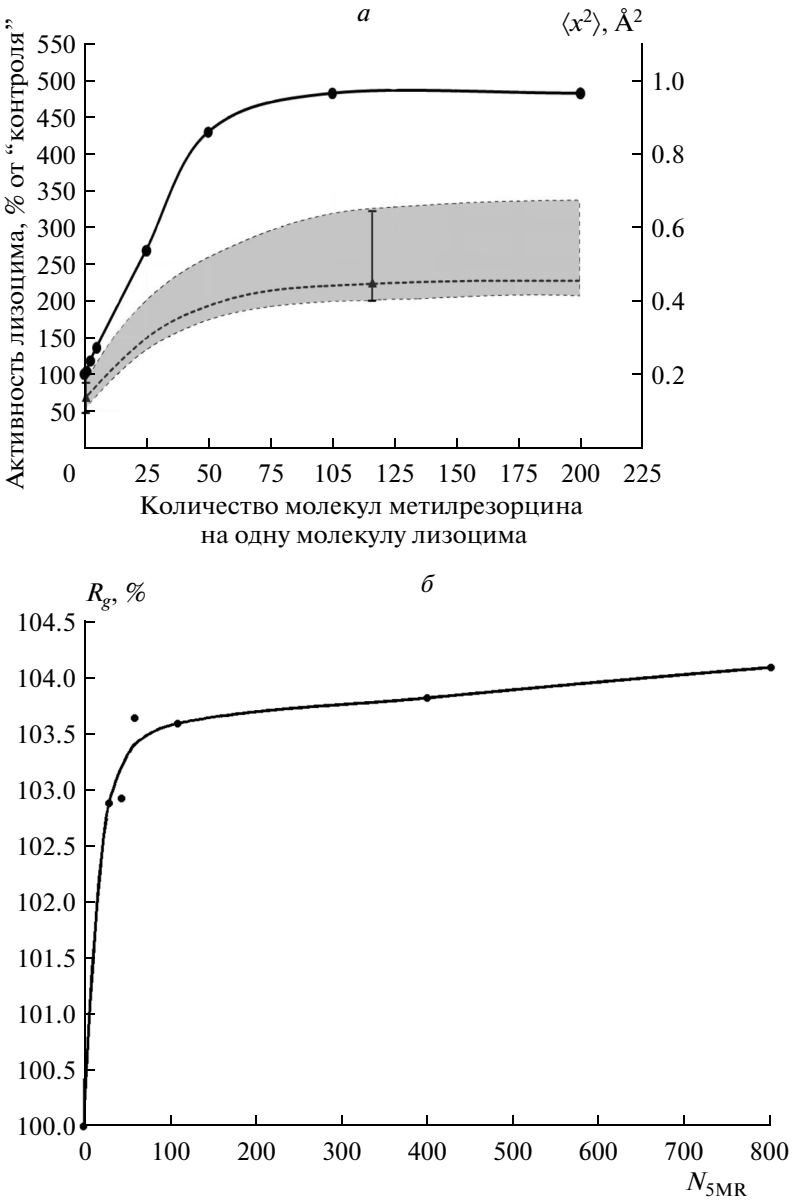


Рис. 2. *а* – Ферментативная активность лизоцима (в качестве субстрата использовался коллоидный хитин) – левая шкала и среднеквадратичная амплитуда смещений атомов $\langle x^2 \rangle$, усредненная по глобуле белка – правая шкала в зависимости от концентрации метилрезорцина, выраженной в количестве молекул метилрезорцина на глобулу лизоцима Недостающие данные для больших концентраций метилрезорцина получены аппроксимацией в предположении, что среднеквадратичная амплитуда смещений атомов пропорциональна активности [34]. *б* – Изменение радиуса гирации R_g лизоцима в процентах от "контроля" (расчетной ячейки без молекул 5-метилрезорцина) относительно количества молекул 5-метилрезорцина в расчетной ячейке, полученное в молекулярно-динамических расчетах.

рядочении водной оболочки вокруг молекулы лизоцима при добавлении 5-метилрезорцина.

Результаты по влиянию метилрезорцина на ферментативную активность лизоцима представлены на рис. 2*а*. В наблюдаемом диапазоне концентраций метилрезорцина наблюдаются резкий рост активности лизоцима после превышения концентрации в 25 молекул метилрезорцина на глобулу лизоцима и дальнейший выход активности на плато. На этом же рисунке также представлена зависимость среднеквадратичной амплитуды смещений атомов белка, усредненной по глобуле (правая шкала), от концентрации метилрезорцина.

Рисунок 2*а* демонстрирует резкое возрастание внутримолекулярных флуктуаций атомных групп лизоцима и повышение его активности при росте концентрации метилрезорцина выше 25 молекул на глобулу. Результаты фурье-анализа интенсивности рассеяния рентгеновских лучей для чистого лизоцима и лизоцима с десятью молекулами

метилрезорцина позволяют сделать вывод о том, что радиус гирации лизоцима не изменяется (в пределах ошибки измерения) при данной концентрации метилрезорцина. Этот факт подтвержден результатами метода малоуглового рассеяния в лаборатории В.В. Волкова из Института кристаллографии РАН (рисунок не приведен). Данные РРМИ (рис. 2*а*) означают, что при концентрации в ~100 молекул на глобулу лизоцима происходит значительное увеличение свободного объема в лизоциме. Столь сильное увеличение амплитуды флуктуаций, несомненно, должно сказаться на температуре денатурации лизоцима. Изучение температуры денатурации T_d лизоцима, проведенное при участии авторов данной статьи [43], показывает сильное понижение T_d с увеличением концентрации метилрезорцина. Понижение температуры денатурации при действии на лизоцим 450 молекул метилрезорцина составляет ощутимую величину в 12 град [43]. Напомним, что понижение температуры денатурации при действии на лизоцим 2 М раствора мочевины (N_2OH_4) составляет всего лишь 8 град. Предварительные результаты авторов показывают, что амплитуда среднеквадратичных флуктуаций начинает заметно увеличиваться лишь при помещении лизоцима в растворы мочевины с концентрацией в 3 М и выше. Внешнее проявление действия метилрезорцина на лизоцим напоминает действие мочевины. Есть, однако, принципиальное различие. При увеличении концентрации метилрезорцина наблюдается резкий рост ферментативной активности, которая выходит на плато, тогда как увеличение концентрации мочевины приводит к разворачиванию глобулы лизоцима и потере белком ферментативной активности.

Для изучения конформационных изменений и структурной организации систем лизоцим–вода–метилрезорцин проведены компьютерные расчеты с помощью метода молекулярной динамики. Методика расчетов приведена в разд. 2.

Результат компьютерного моделирования изображен на рис. 2*б*. В молекулярно-динамических расчетах с различной концентрацией 5-метилрезорцина на одну молекулу лизоцима наблюдается некоторое увеличение R_g белка при увеличении концентрации 5-метилрезорцина от 0 до 800 его молекул на одну молекулу лизоцима (одну расчетную ячейку). При сравнении результатов, приведенных на рис. 2*а* и *б* видно, что кривая активности лизоцима и среднеквадратичное смещение выходят на плато при концентрации примерно в 100 молекул метилрезорцина на молекулу лизоцима. Из сходства двух кривых можно сделать предположение о связи радиуса гирации и активности. Так, при увеличении концентрации 5-метилрезорцина последний, связываясь с поверхностью белка, с одной стороны, несколько увеличивает радиус гирации, а с другой – стабилизирует структуру белка, образуя пространственную древовидную сеть вокруг него и не позволяя происходить процессам денатурации. Увеличение R_g белка возникает за счет проникновения молекул 5-метилрезорцина непосредственно к белку по всей его поверхности и его разрыхления.

Интересно поведение алкилоксибензолов у поверхности белка. Ранее было показано [11], что при взаимодействии с 4-гексилрезорцином основную роль играют водородные связи, образуемые непосредственно с поверхностью лизоцима (см. рис. 3*б*). Также в работе [11] было показано, что поведение метилрезорцина на гидрофильной поверхности не похоже ни на поведение глицерина, ни на поведение гексилрезорцина. Метилрезорцин поистечении 1.0 нс достаточно прочно выбирает свое место на поверхности решетки (лизоцима) и далее (в течение последующей 1 нс) совершает небольшие и короткие флуктуации относительно своего положения. Видимо, это результат достаточно сильного кулоновского взаимодействия между решеткой и водородными атомами метилрезорцина. Возможно, важный вклад вносит стекинг-взаимодействие (детально данный вопрос исследован в данной статье ниже).

Расчеты методом молекулярной динамики, проведенные для систем лизоцима со случайным распределением молекул 5-метилрезорцина в ячейке, подтверждают предположение о непосредственном взаимодействии молекул метилрезорцина с поверхностью белка. Для проверки этой гипотезы были проведены расчеты и рассмотрены графики среднего расстояния от молекул 5-метилрезорцина до белка и средней энергии взаимодействия молекул 5-метилрезорцина с белком (рис. 4). Молекулы 5-метилрезорцина диффундируют вокруг белка, пока энергия взаимодействия молекул 5-метилрезорцина с лизоцимом не превысит своего критического значения, при котором начинается сильное притяжение молекул лиганда к белку, ведущее к уменьшению среднего расстояния между группами белок–лиганд (рис. 4*а*, *б*). Среднее расстояние продолжает уменьшаться до тех пор, пока подавляющее большинство молекул 5-метилрезорцина не образуют комплексы с лизоцимом или другими молекулами 5-метилрезорцина, выстраивая древовидные структуры от поверхности белка (см. рис. 3*б*). На рис. 4*в* показана функция радиального распределения атомов молекул воды и 5-метилрезорцина от поверхности лизоцима (в расчете на атом). Из этого рисунка видно, что большинство молекул 5-метилрезорцина расположено в первой гидратной оболочке лизоцима, т.е. непосредственно на его поверхности. Этот результат полностью согласуется со сделанными ранее выводами о непосредственном взаимодействии 5-метилрезорцина с белком.

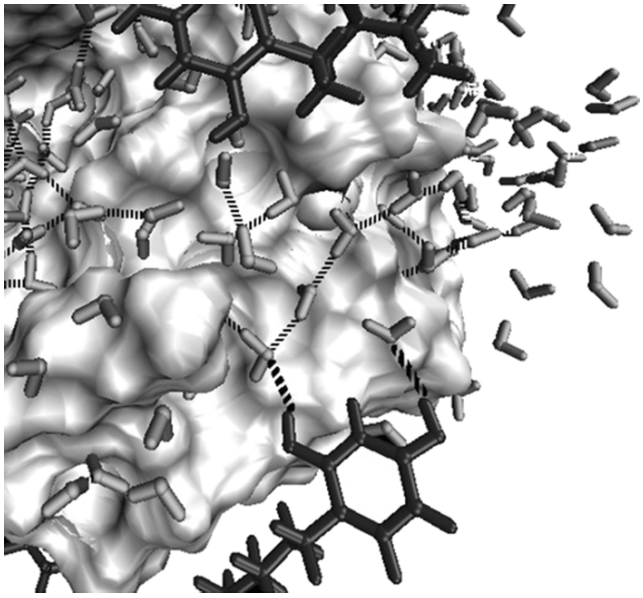
Гидрофобное взаимодействие бензольного кольца с нейтральными атомами решетки, по-видимому, маловероятно, поскольку метилрезорцины часто подходят не плоской стороной, а боком. Таким образом, в случае метилрезорцина говорить о предпочтительной гидратации можно лишь при совсем малых его концентрациях, когда на поверхности есть еще места связывания для воды. При его концентрации выше 30 молекул на глобулу лизоцима взаимодействие метилрезорцина с поверхностью лизоцима начинает резко преобладать над гидратацией. Таким образом, подтверждено, что метилрезорцин взаимодействует с поверхностью лизоцима непосредственно, образуя свои водородные связи с аминокислотами лизоцима, не прибегая к помощи воды, аналогично тому, как глицерин взаимодействует с поверхностью белка резорцина (см. [32]). При увеличении концентрации метилрезорцина до 30 и выше молекул на глобулу на 2 град снижается точка денатурации лизоцима, появляется свободный внутриглобулярный объем, растормаживается внутримолекулярная динамика и резко увеличивается ферментативная активность лизоцима (рис. 2*а*). Среднеквадратичные амплитуды равновесных флуктуаций при ~100 молекулах метилрезорцина на глобулу достигают величины $\approx(0.45 \pm 0.2)$ Å^2, температура денатурации понижается на 4 град.

Таким образом, при изученных концентрациях метилрезорцин является мощным активатором для лизоцима. С помощью молекулярно-динамических расчетов при различных концентрациях 5-метилрезорцина на глобулу лизоцима было показано, что основными сайтами связывания 5-метилрезорцина на поверхности белка являются аминокислотные остатки Asp (18), Asp (87), Lys (116), Arg (128).

3.3. Структура комплексов малых лигандов и их возможные сайты связывания на лизоциме

Исследование структуры комплексов алкилоксибензолов проводилось методами молекулярной динамики и квантовой механики. В первом случае рассматривались траектории подвижности молекул лигандов друг относительно друга в ячейках, содержащих молекулы 5-метилрезорцина и воды, а также лизоцима, 5-метилрезорцина и воды. Методами квантовой механики изучены малые кластеры 5-метилрезорцина (от мономеров до декамеров), кластеры 5-метилрезорцина с молекулами воды, а также кластеры тирозола и 4-гексилрезорцина (рис. 5). Ранее в работе [44] рассматривались энергетические поверхности и структура цепочек, содержащих 5-метилрезорцин и воду. Полученные в этой статье данные полностью согласуются с работой [44] в том, что 5-метилрезорцин не образует стекинг-взаимодействий путем связывания бензольных колец

а



б

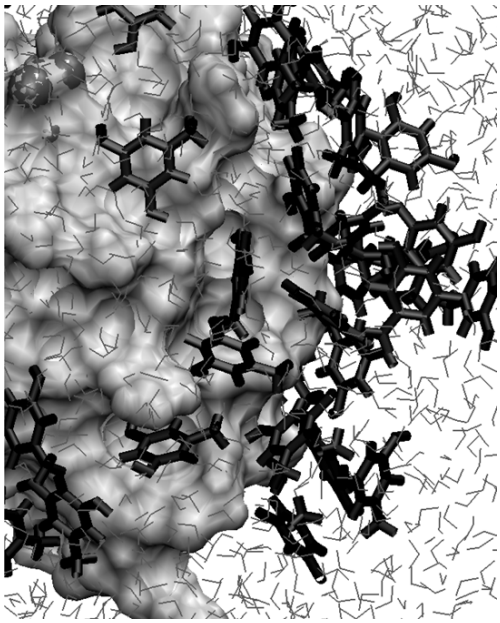


Рис. 3. *а* – Возможный вид связывания молекул гексилрезорцина с гидрофильными областями гидратированного лизоцима. Водородные связи между молекулами воды и между водой и лизоцимом изображены серыми наклонными штрихами. Водородные связи между гексилрезорцином и гидратной водой изображены черными наклонными штрихами [14]. *б* – Поверхность лизоцима с присоединившимися молекулами 5-метилрезорцина

друг с другом. Во всех изученных соединениях (как метилрезорцина и гексилрезорцина, так и тирозола) основным инструментом кластерообразования служат гидроксильные остатки, через которые две или более двух молекул связываются

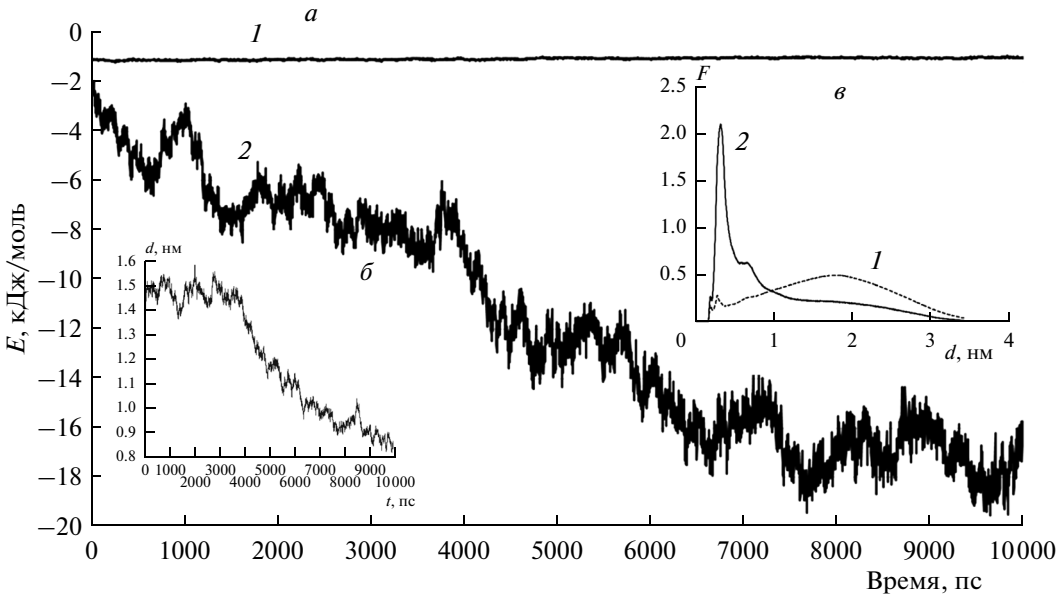


Рис. 4. *а* – Изменение энергии взаимодействия молекул воды (*1*) и 5-метилрезорцина (*2*) с лизоцимом в расчете на одну молекулу. *б* – Дрейф молекул 5-метилрезорцина к поверхности белка для системы со 110 молекулами 5-метилрезорцина. *в* – Функция радиального распределения (F) атомов, входящих в молекулы воды (*1*) и 5-метилрезорцина (*2*) от поверхности лизоцима (в расчете на 1 атом).

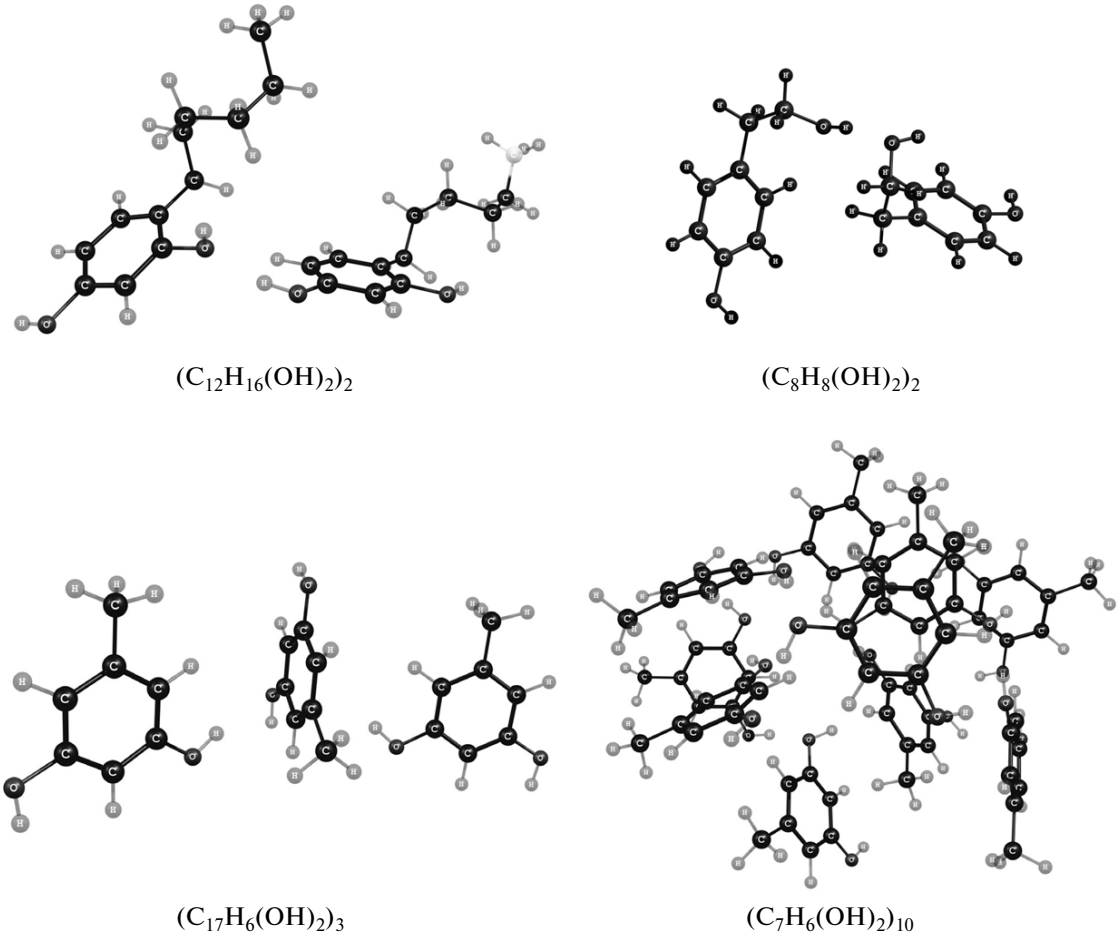


Рис. 5. Некоторые молекулярные кластеры 5-метилрезорцина ($C_7H_6(OH)_2$), 4-гексилрезорцина ($C_{12}H_{16}(OH)_2$) и тирозола ($C_8H_8(OH)_2$).

между собой, с молекулами воды и молекулами белка. При этом из-за пространственного разнесения гидроксильных групп в молекулах тирозола последние образуют более "рыхлые" структуры. Механизм действия этого лиганда на поверхность белка будет исследован позднее. Гипотеза о существовании стекинг-взаимодействий не подтверждается также исходя из результатов расчетов аналога 5-метилрезорцина с разорванным бензольным кольцом.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метилрезорцин, гексилрезорцин и тирозол являются яркими представителями алкилоксибензолов – новых биологически активных веществ, химических аналогов микробных аутоиндукторов анабиоза. Они оказывают влияние как на клетки в целом, так и на отдельные белковые молекулы, довольно быстро вызывая переход микробных клеток из вегетативного состояния в покоящееся (анабиотическое) состояние, и реализуют эту функцию через взаимодействие с широким кругом биополимеров бактериальной клетки. В настоящей работе проведено сравнительное изучение влияния гексилрезорцина и метилрезорцина в большом диапазоне их концентраций на структуру, равновесные флуктуации и функциональную активность водорастворимого фермента лизоцима. Показано, что в отличие от гексилрезорцина метилрезорцин является стабилизатором лизоцима в большом диапазоне концентраций. Из экспериментальных данных [32] следует, что при малых концентрациях как гексилрезорцина, так и метилрезорцина (от 2 до 10 молекул на глобулу) активность лизоцима резко возрастает. Однако с ростом концентрации активность лизоцима начинает падать в случае гексилрезорцина и остается постоянной для метилрезорцина при концентрациях лиганда выше 100 молекул на глобулу. Проведенные молекулярно-динамические расчеты показывают, что при концентрации метилрезорцина выше 100 молекул на глобулу белка не наблюдается дальнейшее увеличение радиуса гирации последнего. Это может свидетельствовать о связи структурно-динамических характеристик лизоцима с его функциональной активностью. Влияние гексилрезорцина и метилрезорцина на характеристики белковой молекулы описываются в рамках предпочтительной гидратации при взаимодействии с гексилрезорцином и непосредственного взаимодействия с молекулами метилрезорцина. Все изученные алкилоксибензолы образуют сложную пространственную сеть между собой и с молекулами воды. Молекула метилрезорцина, как и молекула гексилрезорцина, состоит из гидрофобной (алкильный радикал) и гидрофильной (ароматическое ядро с гидроксильными группами) частей. В отличие от молекулы гексилрезорцина, гидрофобная часть молекулы метилрезорцина относительно мала и не вносит существенного вклада во взаимодействия белок–лиганд даже при малых концентрациях. При увеличении концентрации метилрезорцина молекулы последнего начинают образовывать сложные древовидные пространственные структуры, разделенные "прослойками" из молекул воды. Так как кластеры и древовидные структуры метилрезорцина достаточно стабильны, они позволяют стабилизировать молекулу белка при действии высоких (до 100°C) температур. Однако существование водных прослоек может способствовать проникновению субстрата к активному центру лизоцима, что сказывается на поддержании его активности при высоких концентрациях метилрезорцина. Основными сайтами связывания молекул метилрезорцина на поверхности белка, от которых начинается образование сложных пространственных структур лиганда, являются Asp (18), Asp (87), Lys (116) и Arg (128).

Авторы благодарят за финансовую поддержку Российский фонд фундаментальных исследований (проекты № 12-04-31915 и № 14-04-31608) и Министерство образования и науки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Welch W.J., Brown C.R.* // Cell Stress & Chaperones. 1996. V. 1. № 2. P. 109.
2. *Tatzelt J., Prusiner S.B., Welch W.J.* // EMBO J. 1996. V. 15 № 23. P. 6363.
3. *Финкельштейн А.В., Птицын О.Б.* // Физика белка. М.: Книжный дом "Университет", 2002. С. 374.
4. *Smith A.* // Nature. 2003. V. 426. № 6968 P. 883.
5. *Dobson C.M.* // Ibid. V. 426. № 6968. P. 884.
6. *Cohen F.E., Kelly J.W.* // Ibid. V. 426 № 18. P. 905.
7. *Morello J.P., Petajea-Repo U.E., Bichet D.G., Bouvier M.* // TIPS. 2000. V. 21. P. 466.
8. *Kozubek A., Tyman J.H.P.* // Chem.Rev. 1999. V. 99. №. 1. P. 1.
9. PubChem – база данных биологической активности малых молекул; http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=10436/
10. *Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А. и др.* // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 446.
11. *Крупянский Ю.Ф., Абдулнасыров Э.Г., Лойко Н.Г. и др.* // Хим. физика. 2012. Т. 31. № 3. С. 60.
12. *Крупянский Ю.Ф., Нокс П.П., Лойко Н.Г. и др.* // Биофизика. 2011. Т. 56. № 1. С. 13.
13. *Терешкина К.Б., Крупянский Ю.Ф.* // Тез. XX конф. "Математика. Компьютер. Образование". Дубна: ОИЯИ, 2013 . С. 37
14. *Колпаков А.И., Ильинская О.Н., Беспалов М.М. и др.* // Микробиология. 2000. Т. 69. № 2. С. 224.
15. *Степаненко И.Ю., Шишкина М.Л., Мартиросова Е.И. и др.* // Сб. докл. всерос. науч.-техн. конф.-выставки "Высокоэффективные пищевые техно-

логии, методы и средства для их реализации". М.: ГОУВПО "МГУПП", 2003. С. 195.

16. *Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Степаненко И.Ю и др.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 2. С. 159.
17. *Крупянский Ю.Ф., Ещенко Г.В., Есин С. В. и др.* // Биофизика. 2005. Т. 50. № 6. С. 1002.
18. *Крупянский Ю.Ф., Михайлюк М.Г., Есин С.В. и др.* // Там же. 2006. Т. 51. № 1. С. 150.
19. *Гинье А.* Рентгенография кристаллов. М.: Физматгиз, 1961.
20. *Джеймс Р.* Оптические принципы дифракции рентгеновских лучей. М.: Изд-во иностр. лит., 1950.
21. *Китайгородский А.И.* Рентгеноструктурный анализ мелкокристаллических и аморфных тел. М.: ГИТТЛ, 1953.
22. *Kakudo M., Kasai N.* X-Ray Diffraction by Polymers. Amsterdam–London–New-York: Elsevier Publishing Company, 1972.
23. *Warren B.E., Gingrich N.S.* // Phys. Rev. 1934. V. 46. P. 368.
24. *Волков В.В.* // Матер. V Национ. конф. по применению рентгеновского и синхротронного излучений, нейтронов и электронов для исследования материалов (РСНЭ-2005). М.: ИК РАН, 2005. С. 51.
25. *Свергун Д.И., Фейгин Л.А.* Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука, 1986.
26. *Мессбауэр Р.Л.* // Хим. Физика. 1982. Т. 1. № 10. С. 1297.
27. *Krupyanskii Yu.F, Parak F., Goldanskii V.I. et al.* // Z. f. Naturforchung. 1982. B. 37. S. 57
28. *Goldanskii V.I., Krupyanskii Yu.F.* // Quart. Rev. Biophysics. 1989. V. 22. P. 39.
29. *Krupyanskii Yu.F., Goldanskii V.I., Nienhaus G.U., Parak F.* // Hyperfine Interactions. 1990. V. 53. P. 59.
30. *Крупянский Ю.Ф., Шайтан К.В., Куринов И.В. и др.* // Биофизика. 1988. Т. 33. С. 401.
31. *Krupyanskii Yu.F., Goldanskii V.I.* // Proc. Intern. School of Physics "Enrico Fermi", Amsterdam: IOS Press, 2001. P. 25.
32. *Крупянский Ю.Ф., Нокс П.П., Лойко Н.Г. и др.* // Биофизика. 2011. Т. 56. № 1. С. 8.
33. *McCammon J.A.* // Rep. Prog. Phys. 1984. V. 41. P. 1.
34. *Karplus M., Petsko G.A.* // Nature. 1990. V. 347. P. 631.
35. *Шайтан К.В., Терешкина К.Б.* // Молекулярная динамика белков и пептидов. М.: Ойкос, 2004.
36. *Hess B., Kutzner C., van der Spoel D. et al.* // J. Chem. Theory Comput. 2008. V. 4. C. 435.
37. *Granovsky A.A.* Firefly version 7.1.G; http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html
38. *Zou Q., Bennion B.J., Daggett V., Murphy K.P.* // J. Amer. Chem. Soc. 2002. V. 124. № 7. P. 1192.
39. *Artymiuk P.J., Blake C.C.F., Rice D.W., Wilson K.S.* // Acta Cryst. 1982. V. 38. P. 778.
40. *Boyce S.E., Mobley D.L., Rocklin G.J. et al.* // J. Mol. Biol. 2009. V. 394. P. 747.
41. *Гелиев А.В., До Х.Д., Егоров Б.В. и др.* // Хим. физика. 2011. Т. 30. № 1. С. 66.
42. *Murzin A.G., Finkelstein A.V.* // J. Mol. Biol. 1988. V. 204. P. 749
43. *Plashchina I.G., Zhuravleva I.L., Martirosova E.I. et al.* // Biotechnology, Biodegradation, Water and Foodstuff. N.Y.: Nova Science Publishers, Inc., 2009. P. 45.
44. *Mukherjee A., Grobelny P., Thakur T.S., Desiraju G.R.* // Cryst. Growth Des. 2011. V. 11 № 6. P. 2637.