

01

## Моделирование влияния точечных мутаций на устойчивость белковых димеров на примере семейства белков Bcl-2

© Т.В. Кошлан,<sup>1</sup> К.Г. Куликов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
199034 Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
195251 Санкт-Петербург, Россия  
e-mail: kulikov.kirill.g@gmail.com

Поступило в Редакцию 3 июня 2019 г.

В окончательной редакции 3 июня 2019 г.

Принята к публикации 31 июля 2019 г.

Разработан новый метод, который позволит синтезировать пептиды с заданными физико-химическими свойствами, например, с высокой аффинностью к одному целевому белку, добиваясь низкой аффинности к другим белкам, и определять устойчивость белковых комплексов при точечных заменах аминокислотных остатков с учетом трехмерной структуры комплекса на примере семейства белков Bcl2, тем самым добиваясь точечной терапевтической избирательности при лечении различных патологий.

**Ключевые слова:** константа диссоциации, трехмерная структура, энтропия, аминокислотный остаток.

DOI: 10.21883/JTF.2020.04.49076.230-19

### Введение

Настоящая работа посвящена разработке биофизического подхода для отбора высокоселективных пептидов к целевым белкам, которые будут ингибировать/активировать их биологическую активность при различных видах патологических заболеваний.

Разработанный в настоящей работе метод позволяет анализировать изменение стабильности белковых комплексов при замене аминокислотных остатков, как это продемонстрировано на примере белковых димеров Bcl-2–BH3-Вах. При этом BH3-Вах является коротким участком полипептидной цепи, принимающим активное участие в образовании димера Bcl-2-Вах.

Ранее выполненные клинические исследования [1] продемонстрировали возможность использования пептидной вакцинации в терапии больных раком головы и шеи. Отметим, что среднее время выживания составило 8.1 месяца для пациентов с иммунным ответом, а у пациентов, у которых не было индуцированного иммунного ответа на вакцинацию, среднее время выживания составило 1.4 месяца. Также у некоторых пациентов наблюдалась стабильная ремиссия и увеличение продолжительности периода без прогрессирования болезни. Следует также отметить, что результатом II этапа клинических испытаний является полное выздоровление пациента на четвертой стадии заболевания. После 16 циклов вакцинации рецидивирующие и метастатические опухоли исчезли. Вакцинация с использованием комбинации мультиэпитопных пептидов, в качестве монотерапии, может обеспечить клиническую пользу для пациентов.

В настоящей работе мы предлагаем метод подбора высокоселективных пептидов к белкам мишеням. В отличие от химиопрепаратов пептиды являются селектив-

ными эффективными сигнальными молекулами, которые связываются с определенными рецепторами или ионными каналами, приводя к внутриклеточным эффектам. Поскольку пептиды отличаются высокой селективностью и эффективностью и в то же время характеризуются относительной безопасностью и переносимостью, они представляют собой отличную отправную точку для разработки новых терапевтических средств, а их специфичность демонстрирует прекрасные профили безопасности, переносимости и эффективности с различной патологией. Мы полагаем, что дальнейшее развитие пептидных лекарств будет основываться на применении компьютерного и математического моделирования для нахождения оптимальных пептидов с учетом средства к их мишеням, а так же для улучшения их химических и физических свойств, что определяет новизну настоящей работы.

Отметим, что при введении мутаций в пептиды можно влиять на их физико-химические свойства. При этом мутации в белках имеют существенное значение для их биологической активности. Так, при мутациях в определенном домене может снизиться его способность вступать в химические реакции с другими молекулами, что, в свою очередь, повлечет нарушение биологической активности целого белка и нарушение биохимических процессов в клетке. Экспериментальные исследования по определению влияния мутаций в белках на изменение их структуры и биологической активности очень трудоемкие и требуют большого количества денежных средств и времени.

Предлагаемый теоретический метод позволяет учитывать изменение стабильности биологического комплекса при точечных мутациях в белках, а также получить

информацию о распределении потенциальной энергии электростатического взаимодействия с указанием расположения ключевых аминокислотных остатков при формировании биологического комплекса. Исходя из наглядной карты взаимодействия двух белков, которая получена на основе нашего метода, мы можем определить является ли комплекс устойчивым при замене ключевых аминокислотных остатков, что, в свою очередь, будет качественно совпадать с экспериментальной измеренной величиной  $K_d$  (константа диссоциации). Таким образом, анализ полученных результатов позволяет идентифицировать аминокислотные остатки, играющие существенную роль в формировании биологического комплекса.

Оригинальность представленной работы заключается в том, что разработанная биофизическая модель позволяет:

1. Определять ключевые аминокислотные остатки в белковом комплексе, на которые приходится максимальные значения потенциальной энергии электростатического взаимодействия.

2. Определить влияние точечных мутаций в пептидах на стабильность образующихся биологических комплексов с белком. Качественно определять диапазон изменения  $K_d$  при точечных мутациях, когда пептиды связываются с активным белковым сайтом.

3. Определять активные сайты взаимодействия между белками, когда они образованы подряд расположенными аминокислотными остатками двух белков при неизвестной трехмерной структуре белков.

Для современной протеомики исследование и предсказание белковых взаимодействий являются задачами огромной важности, поскольку они определяют функцию белков на уровнях начиная от клетки и заканчивая уровнем всего организма. Для белков, структура которых известна, поиск межмолекулярных взаимодействий по известным данным о строении их третичной структуры сводится к задачам поиска геометрической комплементарности участков двух взаимодействующих молекулярных поверхностей и моделирования их контактов, так называемого молекулярного докинга [2]. Задача молекулярного докинга является задачей алгоритма конформационного поиска, который сводится к перебору конформационного пространства образовавшегося биологического комплекса за счет варьирования торсионных углов белковых молекул.

Современные алгоритмы конформационного поиска в большинстве случаев находят конформации, которые в целом близки к экспериментально найденным структурам за сравнительно небольшое время. Тем не менее есть факторы, которые также оказывают существенное влияние на успешность докинга, которые часто не учитываются в стандартных алгоритмах. Один из таких факторов является конформационная подвижность белка-мишени. Диапазон подвижности может быть разным — начиная с небольшой „подстройки“ боковых цепей и заканчивая масштабными доменными движениями [3].

Эти движения играют существенную роль. На первый взгляд самым логичным решением этой проблемы является учет подвижности белка в программе докинга. К сожалению, современные вычислительные средства не позволяют проводить такое моделирование за приемлемое время, так как молекула белка очень велика, и учет подвижности по всем степеням свободы может привести к так называемому „комбинаторному взрыву“ (астрономическому увеличению числа возможных вариантов). Лишь в некоторых программах предусмотрена ограниченная подвижность сайтов связывания белка (как правило, на уровне небольшой адаптации конформаций боковых цепей остатков активного центра). Другой подход к этой проблеме состоит в докинге в несколько разных конформаций одного и того же белка с последующим выбором лучших решений из каждого запуска докинга. Третий подход — найти некоторую универсальную структуру белка-мишени, с участием которой докинг давал бы достаточно хорошие результаты для различных классов лигандов. При этом уменьшается число „пропущенных“ (но правильных) решений, однако также сильно возрастает и число неверных вариантов [4]. Так же следует отметить, что большинство программ для теоретической стыковки белков работают по следующему принципу: один белок фиксируется в пространстве, а второй поворачивается вокруг него различными способами. При этом для каждой конфигурации поворотов производятся оценочные расчеты по оценочной функции. Оценочная функция основана на поверхностной комплементарности (взаимное соответствие дополняющих друг друга структур (макромолекул, радикалов), определяемое их химическими свойствами), электростатических взаимодействиях, ван-дер-ваальсовском отталкивании и так далее. Проблема при этом поиске в том, что вычисления по всему конфигурационному пространству требуют много времени на вычисления, редко приводя к единственному решению [5,6].

В отличие от приведенных выше алгоритмов компьютерного моделирования в настоящей работе разработаны математические алгоритмы, которые позволяют определить нахождение активных участков белков и выявить стабильность различных участков белковых комплексов на основе трехмерной структуры путем анализа матрицы потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия между различными сайтами биологического комплекса.

Разработанный в настоящей работе математический подход в дополнение к работам по молекулярной динамике позволит теоретически спрогнозировать прохождение биохимической реакции в выбранном направлении с заданными аминокислотными последовательностями, выявить стабильность различных участков белковых комплексов путем анализа матрицы потенциальной энергии электростатического взаимодействия между различными сайтами биологического комплекса, а также исследовать влияние точечных мутаций в ВНЗ-пептидах

на стабильность образованного ими биологического комплекса с проапоптотическими белками семейства Bcl-2 и качественно определять константы диссоциации при связывании различных ВНЗ-пептидов с белками Bcl-2.

В перспективе это позволит решать фундаментальные и прикладные проблемы медицины, например, разрабатывать новые лекарственные средства, изучать процессы происходящие при развитии болезней, что является актуальной задачей.

Настоящая работа состоит из нескольких разделов. Первый раздел работы посвящен структуре и функциям семейства белков Bcl-2. Второй раздел посвящен описанию разработанных численных алгоритмов. В третьем разделе приводятся результаты численных расчетов мутаций на примере биологического комплекса Bcl-2–ВНЗ-Вах. Так же представлен анализ формирования трехмерной структуры белка Bcl-2, обозначены аминокислотные остатки, принимающие активное участие в формировании трехмерной структуры димера, определены их месторасположения. Приведены графики корреляции теоретически найденных величин: мера изменения упорядоченности ( $\Delta H$ ), логарифм числа обусловленности матрицы, элементами которой являются потенциальные энергии электростатического взаимодействия между попарно взятыми аминокислотными остатками с ( $K_d$ ).

## 1. Структура и функции белков семейства Bcl-2

Белки семейства В-клеточной лимфомы-2 (Bcl-2) контролируют собственный апоптотический путь, регулируя процесс пермеабилзации наружной мембраны митохондрий через белок-белковые взаимодействия.

Структурные и биохимические исследования показали двойную роль антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в ингибировании белков ВНЗ-only и в сдерживании активированных белков Вах, Вак. Подробно взаимодействия между белками семейства Bcl-2 представлено в [7].

Белки семейства Bcl-2 можно разделить на 3 группы на основании их структуры и внутриклеточных функций:

1) проапоптотические белки Вах и Вак, которые известны, как эффекторы апоптоза.

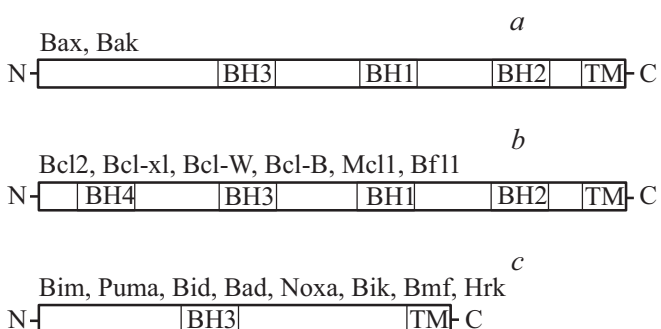


Рис. 1. Структура семейства белков Bcl-2

Данная группа белков содержит 3 домена ВН1-ВН3 и может непосредственно пермеабиллизировать наружную мембрану митохондрий при активации.

Мономер Вах представляет собой глобулярную структуру с образованием гидрофобной канавки, образованную  $\alpha 3$ -,  $\alpha 4$ -,  $\alpha 5$ -спиралями. При этом участок С-конца белка Вах, который является  $\alpha 9$ -спиралью, занимает эту гидрофобную канавку. В отличие от белка Вах гидрофобная канавка белка Вак пуста. Обычно Вак находится в связанном состоянии с цитоплазматической поверхностью наружной мембраны митохондрий через С-концевой гидрофобный ТМ домен в отличие от Вах, который находится в цитозоле. В результате структурных различий предполагается, что механизмы активации Вах и Вак различны.

Активация Вах инициируется путем связывания активирующих лигандов с N-концевым доменом. Это приводит к конформационным изменениям, которые влекут за собой высвобождение  $\alpha 9$ -спирали из гидрофобной канавки, что способствует транслокации Вах из цитоплазмы на поверхность митохондрии. Помимо этого происходит дополнительная активация путем связывания лигандов с освобожденной гидрофобной канавкой. Активация Вак инициируется доменом ВН3, который связывается с гидрофобной канавкой. Схема структуры белков семейства Bcl-2 приведена на рис. 1.

2) антиапоптотические белки (репрессоры): Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w, Bcl-B, Mcl1, A1, Bfl1. Эти белки содержат все 4 консервативные гомологичные области домена ВН1-ВН4. С-конец содержит гидрофобный домен ТМ и отвечает за связывание этих белков с внутриклеточной мембраной, в частности, с наружной мембраной митохондрий. Антиапоптотические белки ингибируют апоптоз путем связывания проапоптотических ВНЗ-only белков и белков эффекторов Вак и Вах, тем самым предотвращая пермеабилзацию наружной мембраны митохондрий. Способность антиапоптотических белков Bcl-2 связываться с различными проапоптотическими белками семейства Bcl-2 варьируется.

Так, белки Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w связываются почти со всеми апоптотическими белками более эффективно, чем Bcl-B, Mcl1, Bfl1. Антиапоптотические белки обладают индивидуальной сходной глобулярной структурой, содержащей „ядро Bcl-2“. Это ядро состоит из восьми  $\alpha$ -спиралей, которые образуют гидрофобную канавку, фланкированную доменами ВН1 и ВН3. Эта гидрофобная канавка имеет решающее значение для биологии антиапоптотических белков семейства Bcl-2, поскольку она обеспечивает интерфейс для взаимодействия ВН3 доменов ВНЗ-only белков и антиапоптотических эффекторов Вак и Вах.

Основываясь на структуре гидрофобной канавки, были разработаны различные имитаторы области ВН3, которые могут занять эту канавку и, таким образом, инактивировать антиапоптотические функции этих белков.

3) третья группа белков: ВНЗ-only белки (активаторы). Эту группу составляют белки: Bim, Puma, Bid,

Bad, Noxa, Bik, Bmf, Hrk. Эти белки содержат только 15–25 остатков ВН3-домена, однако наличие этого домена играет решающее значение для взаимодействия этих белков с другими белками семейства Bcl-2 при регулировании пермеаблизации наружной мембраны митохондрий.

Важной ролью белков группы ВН3-only является передача различных сигналов для инициирования пермеаблизации наружной мембраны митохондрий. Белки ВН3-only активируются различными цитотоксическими стимулами.

Данную группу белков можно разделить на прямые активаторы и сенсibilизаторы. По мере получения проапоптических сигналов, например повреждение ДНК, клеточный стресс, такие белки, как Bid или Bad, стимулируют и конкурируют с эффекторами за связывание с репрессорами и при этом не только нейтрализуют антиапоптические действия репрессоров, но и приводят к проапоптическому действию эффекторов.

Эффекторы впоследствии иницируют апоптозную гибель клеток путем встраивания в наружную мембрану митохондрий, что служит причиной образования пор в мембранах. Это приводит к освобождению апоптогенных факторов, таких как цитохром С и Smac/Diablo из митохондрий в цитозоль [8].

Таким образом, согласованное действие различных белков Bcl-2 позволяет держать под контролем апоптоз в здоровой клетке, в то время, как нарушение в регуляции ведет к серьезным патологическим последствиям.

Образование гетеродимеров между различными белками семейства Bcl-2 определяет выживет клетка или нет [9]. Семейство Bcl-2 является важной терапевтической целью из-за чрезмерной экспрессии в раковых клетках, где данные белки вносят вклад в онкогенез и устойчивость к химиотерапии.

## 2. Описание алгоритма

Нами были разработаны алгоритм и программный комплекс для анализа белковых взаимодействий с учетом их трехмерной структуры из PDB-базы данных.

Он состоял в том, что из [10] брался белок Bcl-2–ВН3–Вах (название файла в базе PDB–„2XA0.pdb“) и разбивался на два файла: Bcl-2.pdb и ВН3–Вах.pdb. При этом для каждого белка (Bcl-2.pdb и ВН3–Вах.pdb) мы сохраняли файл с его координатами атомов.

Затем вычислялись следующие физические характеристики:

1. Координаты центра масс для каждого  $i$ -го аминокислотного остатка полипептидной цепи белка Bcl-2.pdb

$$x_{c_{i,j}} = \frac{\sum_{i,j=1}^n x_{i,j} \cdot m_{i,j}}{\sum_{i,j=1}^n m_{i,j}}, \quad y_{c_{i,j}} = \frac{\sum_{i,j=1}^n y_{i,j} \cdot m_{i,j}}{\sum_{i,j=1}^n m_{i,j}},$$

$$z_{c_{i,j}} = \frac{\sum_{i,j=1}^n z_{i,j} \cdot m_{i,j}}{\sum_{i,j=1}^n m_{i,j}}, \quad (1)$$

	A	R	Q	T
V	W <sub>11</sub>	W <sub>12</sub>	W <sub>13</sub>	W <sub>14</sub>
A	W <sub>21</sub>	W <sub>22</sub>	W <sub>23</sub>	W <sub>24</sub>
R	W <sub>31</sub>	W <sub>32</sub>	W <sub>33</sub>	W <sub>34</sub>
Q	W <sub>41</sub>	W <sub>42</sub>	W <sub>43</sub>	W <sub>44</sub>

**Рис. 2.** Пример представления матрицы потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия  $W_{ij}$ ,  $i = \overline{1, 4}$ ,  $j = \overline{1, 4}$  для четырех аминокислотных остатков двух белков  $P_1$  и  $P_2$ .

где  $x_i, y_i, z_i$  и  $x_j, y_j, z_j$  — координаты атомов  $i$ -ой и соответственно  $j$ -ой молекулы аминокислотного остатка полипептидной цепи белка,  $m_i$  и  $m_j$  — массы атомов  $i$ -ой и  $j$ -ой молекулы аминокислотного остатка полипептидной цепи белка.

При этом координаты центра масс для каждого  $j$ -го а. а. полипептидной цепи белка ВН3–Вах.pdb будут определяться аналогично выражению (1).

Далее формировалась вектор-строка, состоящая из координат центра масс  $p_i = (x_{c_i}, y_{c_i}, z_{c_i})$  для каждого  $i$ -го аминокислотного остатка белка (Bcl-2.pdb). Аналогично формировалась вектор-строка, состоящая из координат центра масс  $q_j = (x_{c_j}, y_{c_j}, z_{c_j})$  для каждого  $j$ -го аминокислотного остатка белка (ВН3–Вах.pdb) и находилось соответствующее расстояние между центрами масс  $i$ -го и  $j$ -го аминокислотного остатка белков (Bcl-2.pdb и ВН3–Вах.pdb)

$$d(p_i, q_j) = \sqrt{\sum_{k=1}^N (p_{ki} - q_{kj})^2}, \quad (2)$$

где  $i = \overline{1, n}$ ,  $j = \overline{1, m}$ .

Проведенные эксперименты [11] свидетельствуют о том, что взаимодействие белковых молекул описывается электростатическим взаимодействием. Таким образом, мы вычисляли потенциальную энергию электростатического взаимодействия между попарно взятыми аминокислотными остатками рассмотренных белков

$$W_{i,j} = k \frac{Q_i \cdot Q_j}{d(p_i, q_j)},$$

где  $k = 1/4\pi\epsilon_0\epsilon$ ,  $\epsilon_0$  — электрическая постоянная,  $\epsilon$  — диэлектрическая проницаемость среды,  $Q_i, Q_j$  — заряд соответственно  $i$ -го и  $j$ -го аминокислотного остатка брался из [12],  $d(p_i, q_j)$  определен выражением (2) и полученные значения записывали в матрицу (рис. 2), при этом введены обозначения для А — аланин, R — аргинин, Q — глутамин, T — треонин, V — валин.

Для анализа биохимических процессов используем определение числа обусловленности  $\text{cond}(W_0)$

матрицы  $W_0$ :

$$\text{cond}(W_0) = \frac{\sigma_{\max}(W_0)}{\sigma_{\min}(W_0)}, \quad (3)$$

где  $W_0 = (W_{ij})$  — матрица стационарных потенциальных энергий связи между фрагментами биокомплекса,  $\sigma_{\max}(W_0)$ ,  $\sigma_{\min}(W_0)$  — наибольшие и наименьшие сингулярные числа матрицы  $W_0$ . Для вычисления числа обусловленности мы использовали алгоритм Kogbetliantz [13].

В данной физической постановке задачи оно будет характеризовать степень устойчивости конфигурации биологического комплекса. При этом для выбора более устойчивого (стабильного) биохимического соединения между белками мы выбираем матрицу потенциальной энергии электростатического взаимодействия с наименьшим значением числа обусловленности [14].

Отметим, что в нашей модели мы предполагаем, что при замене одного аминокислотного остатка в белке не происходит существенных изменений в трехмерной структуре биологического комплекса.

### 3. Результаты численных расчетов Bcl-2—BH3-Vax

В разд. 3 будут приведены численные расчеты, карты белковых взаимодействий, описано нахождение ключевых аминокислотных остатков в пептидах, а так же расписана методика нахождения диапазона значений  $K_d$  при точечных мутациях в полипептидной цепи пептида при его связывании с белком.

В этой части приведем результаты численных расчетов взаимодействия на примере белка Bcl-2 и активного участка BH3-Vax с учетом замен а.а. (amino acid — аминокислотные остатки). При введении замен а.а. в полипептидной цепи пептида мы предполагаем, что такая замена не принесет существенных изменений в трехмерную структуру всего биологического комплекса Bcl-2—BH3-Vax.

Поскольку трехмерная структура биологического комплекса содержит не все а.а.т.н.е белка Bcl-2, то для

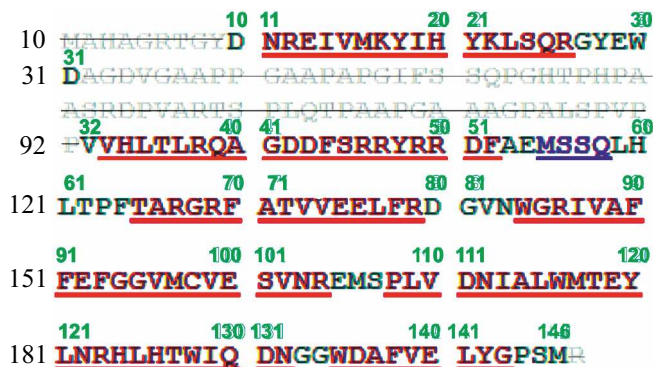


Рис. 3. Схема нумерации присутствующих а.а. белка Bcl-2 в PDB базе под номером 2XA0 [10].

Таблица 1. Таблица замен а.а. белка BH3-Vax и  $K_d$  при связывании с Bcl-2 [15]

Мутации	N а.а	Аминокислотная последовательность BH3-Vax	$K_d$ , nM
wt	wt	LSECLRRIGDELDSNMELQRMIAD	15.1±1.95
m1	E61A	LSACLRRIGDELDSNMELQRMIAD	95.2±3.28
m2	R64A	LSECLARRIGDELDSNMELQRMIAD	129±6.5
m3	D68A	LSECLRRIGAELDSNMELQRMIAD	1040±55.8
m4	E69A	LSECLRRIGDALDSNMELQRMIAD	476±18.1
m5	R76A	LSECLRRIGDELDSNMELQAMIAD	57.1±5.45
No experimental data			
m6	C62W	LSEWLRRIGDELDSNMELQRMIAD	N/A

59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82  
 L S E C L R R I G D E L D S N M E L Q R M I A D

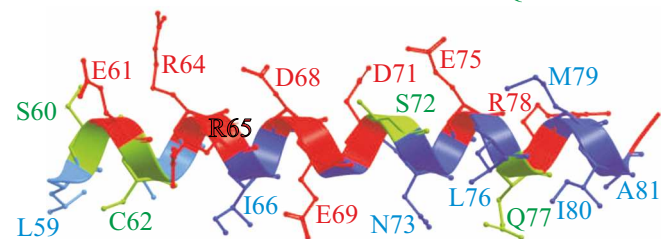


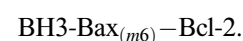
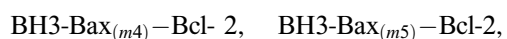
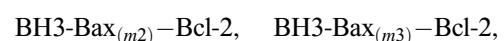
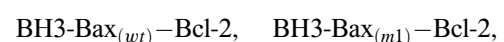
Рис. 4. Трехмерная структура BH3-Vax с указанием а.а.

удобства представления на последующих графиках и картах мы пронумеровали присутствующие а.а. белка Bcl-2, как это показано на рис. 3.

В [15] была установлена структура связывания белка Bcl-2 с участком белка Vax. Отметим, что пептид белка Vax формирует амфифильную  $\alpha$ -спираль и связывается с гидрофобной канавкой Bcl-2. Структура белкового комплекса дикого типа Bcl-2—BH3-Vax представлена в базе PDB под номером 2XA0 [10].

Также в [15] были определены константы диссоциации при связывании мутантных пептидов BH3-Vax с Bcl-2. При этом аминокислотные последовательности BH3 пептида белка Vax с выполненными заменами а.а., а также константы диссоциации при связывании каждого пептида с белком Bcl-2 приведены в табл. 1.

В настоящей работе мы применяем для обработки полученных численных данных величину  $\lg(\text{cond}(W))$ , которая в данной постановке задачи характеризует стабильность биологического комплекса с участием Bcl-2 и Vax:





**Таблица 2.** Значения потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия ключевых а. а. белка Vcl-2<sub>(R107–A113)</sub> и замененных а. а. для ВНЗ-Вах<sub>(wt)</sub>, ВНЗ-Вах<sub>(m1)</sub>, ВНЗ-Вах<sub>(m2)</sub>, ВНЗ-Вах<sub>(m6)</sub>

Аминокислотные остатки Вh3 Вах		Потенциальная энергия электростатического взаимодействия, <i>J</i> Аминокислотные остатки белка Vcl-2						
		R107	Y108	R109	R109	ASP	F112	A113
wt	E61	$1.86 \cdot 10^{-22}$	$1.42 \cdot 10^{-22}$	$1.70 \cdot 10^{-22}$	$1.93 \cdot 10^{-22}$	$2.2 \cdot 10^{-24}$	$-2.21 \cdot 10^{-22}$	$-3.11 \cdot 10^{-22}$
m1	A61	$-2.81 \cdot 10^{-21}$	$2.1 \cdot 10^{-21}$	$-2.58 \cdot 10^{-21}$	$-2.92 \cdot 10^{-21}$	$-3.3 \cdot 10^{-23}$	$3.34 \cdot 10^{-21}$	$4.71 \cdot 10^{-21}$
wt	R64	$2.06 \cdot 10^{-21}$	$-1.36 \cdot 10^{-21}$	$1.68 \cdot 10^{-21}$	$1.88 \cdot 10^{-21}$	$1.95 \cdot 10^{-23}$	$-1.83 \cdot 10^{-21}$	$-2.68 \cdot 10^{-21}$
m2	A64	$-3.84 \cdot 10^{-21}$	$3.55 \cdot 10^{-21}$	$-3.57 \cdot 10^{-21}$	$-3.47 \cdot 10^{-23}$	$-3.6 \cdot 10^{-23}$	$3.82 \cdot 10^{-21}$	$5.65 \cdot 10^{-21}$
wt	c62	$-5.40 \cdot 10^{-21}$	$5.91 \cdot 10^{-21}$	$-5.34 \cdot 10^{-21}$	$-5.89 \cdot 10^{-21}$	$-7.1 \cdot 10^{-23}$	$8.94 \cdot 10^{-21}$	$1.03 \cdot 10^{-20}$
m6	W62	$-1.94 \cdot 10^{-21}$	$2.12 \cdot 10^{-21}$	$-1.9 \cdot 10^{-21}$	$-2.1 \cdot 10^{-21}$	$-2.6 \cdot 10^{-23}$	$3.21 \cdot 10^{-21}$	$3.71 \cdot 10^{-21}$

**Таблица 3.** Значения потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия ключевых а. а. белка Vcl-2<sub>(A131–R140)</sub> и замененных а. а. для ВНЗ-Вах<sub>(wt)</sub>, ВНЗ-Вах<sub>(m1)</sub>, ВНЗ-Вах<sub>(m2)</sub>, ВНЗ-Вах<sub>(m6)</sub>

Аминокислотные остатки Вh3 Вах		Потенциальная энергия электростатического взаимодействия, <i>J</i> Аминокислотные остатки белка Vcl-2									
		A131	T132	V133	V134	E135	E136	L137	F138	R139	R140
wt	E61	$-3.00 \cdot 10^{-22}$	$-1.9 \cdot 10^{-22}$	$-2.3 \cdot 10^{-22}$	$-1.9 \cdot 10^{-22}$	$2.24 \cdot 10^{-23}$	$-3.55 \cdot 10^{-23}$	$-2.57 \cdot 10^{-22}$	$-1.9 \cdot 10^{-22}$	$3.31 \cdot 10^{-22}$	$2.46 \cdot 10^{-24}$
m1	A61	$4.54 \cdot 10^{-21}$	$2.91 \cdot 10^{-21}$	$3.51 \cdot 10^{-21}$	$2.85 \cdot 10^{-21}$	$-3.4 \cdot 10^{-22}$	$-5.4 \cdot 10^{-22}$	$3.89 \cdot 10^{-21}$	$2.86 \cdot 10^{-21}$	$-5.02 \cdot 10^{-21}$	$3.7 \cdot 10^{-23}$
wt	C62	$6.13 \cdot 10^{-21}$	$3.66 \cdot 10^{-21}$	$4.76 \cdot 10^{-21}$	$3.88 \cdot 10^{-21}$	$-4.1 \cdot 10^{-22}$	$-5.5 \cdot 10^{-22}$	$4.94 \cdot 10^{-21}$	$3.65 \cdot 10^{-21}$	$-4.88 \cdot 10^{-21}$	$-4 \cdot 10^{-23}$
m6	W62	$2.20 \cdot 10^{-21}$	$1.31 \cdot 10^{-21}$	$1.71 \cdot 10^{-21}$	$1.39 \cdot 10^{-21}$	$-1.5 \cdot 10^{-22}$	$-2 \cdot 10^{-22}$	$1.77 \cdot 10^{-21}$	$1.31 \cdot 10^{-21}$	$-1.747 \cdot 10^{-21}$	$-1.4 \cdot 10^{-23}$
wt	R64	$-3.20 \cdot 10^{-21}$	$1.9 \cdot 10^{-21}$	$-2.4 \cdot 10^{-21}$	$-2.3 \cdot 10^{-21}$	$2.57 \cdot 10^{-22}$	$3.86 \cdot 10^{-22}$	$-4.58 \cdot 10^{-21}$	$-3 \cdot 10^{-21}$	$4.26 \cdot 10^{-21}$	$3.84 \cdot 10^{-23}$
m6	A64	$4.80 \cdot 10^{-21}$	$2.82 \cdot 10^{-21}$	$3.55 \cdot 10^{-21}$	$3.48 \cdot 10^{-21}$	$-3.8 \cdot 10^{-22}$	$-5.8 \cdot 10^{-22}$	$6.88 \cdot 10^{-21}$	$4.48 \cdot 10^{-21}$	$-6.39 \cdot 10^{-21}$	$-5.8 \cdot 10^{-23}$

Данные взаимодействия стабилизируются через большое количество внутримолекулярных контактов. Трехмерная структура пептида ВНЗ домена белка Вах и его аминокислотная последовательность представлены на рис. 4

Для анализа адекватности построенной физической модели будем анализировать качественную связь между экспериментально полученной величиной  $K_d$  [15] и полученными нами численными результатами.

Табл. 1 содержит перечень замен а. а. в ВНЗ-Вах, а так же экспериментально измеренную величину  $K_d$  [15] при связывании с Vcl-2 с № 1 по № 6. Отметим, что № 7 не имеет предварительно измеренной величины  $K_d$ .

Как видно из табл. 1, мутации с „m1“ по „m5“ мы заменяли заряженные а. а. на гидрофобный аланин (выделен красным цветом), поскольку в [15] было выдвинуто предположение, что данные а. а. принимают активное участие в образовании биологического комплекса с белком Vcl-2. В мутации „m6“ была выполнена замена гидрофильного а. а. цистеина на гидрофобный триптофан. Отметим, что замену „m6“, которая определена под

№ 7 в табл. 1, мы ввели, поскольку, согласно нашим расчетам, С62 является ключевым гидрофильным а. а., на долю которого приходится максимальные значения потенциальной энергии электростатического взаимодействия (см. табл. 2, 3).

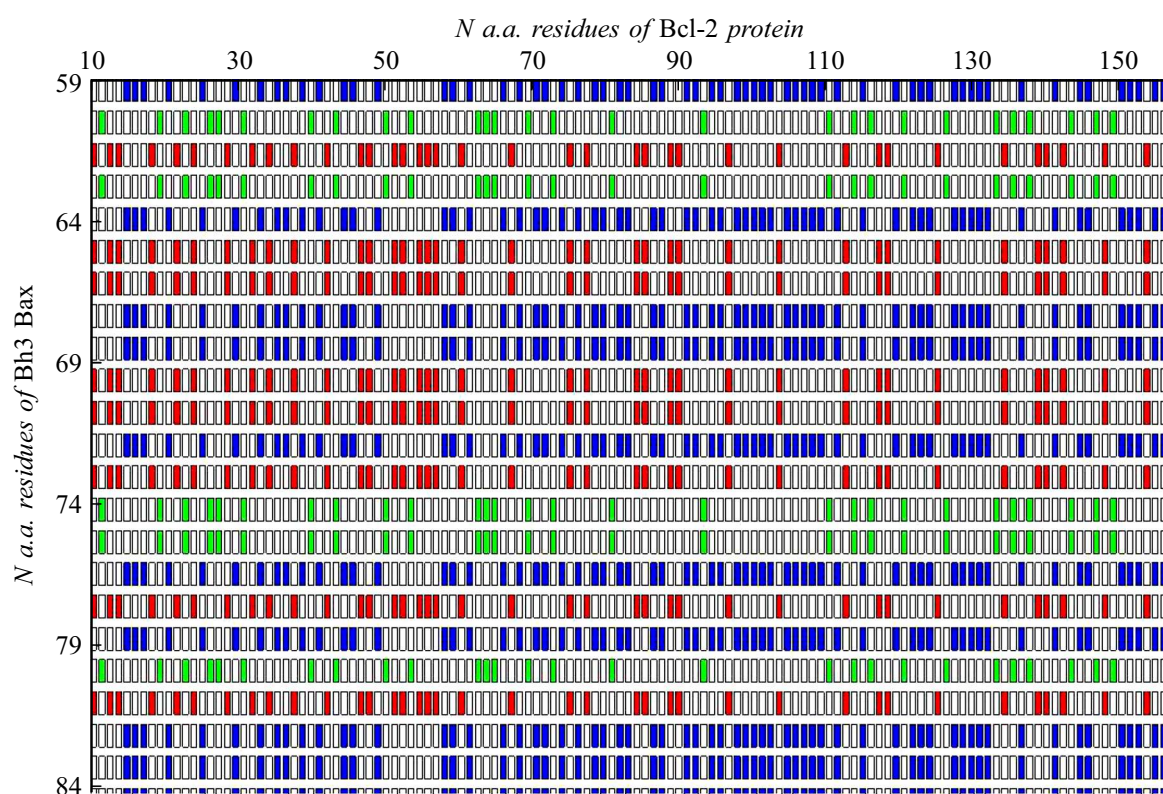
Далее исследуем взаимодействия между различными а. а.: гидрофильными, гидрофобными и заряженными.

Представим взаимодействия Vcl-2 и ВНЗ-Вах в виде двумерной карты, которая будет отображать природу взаимодействующих а. а. (рис. 5, 6).

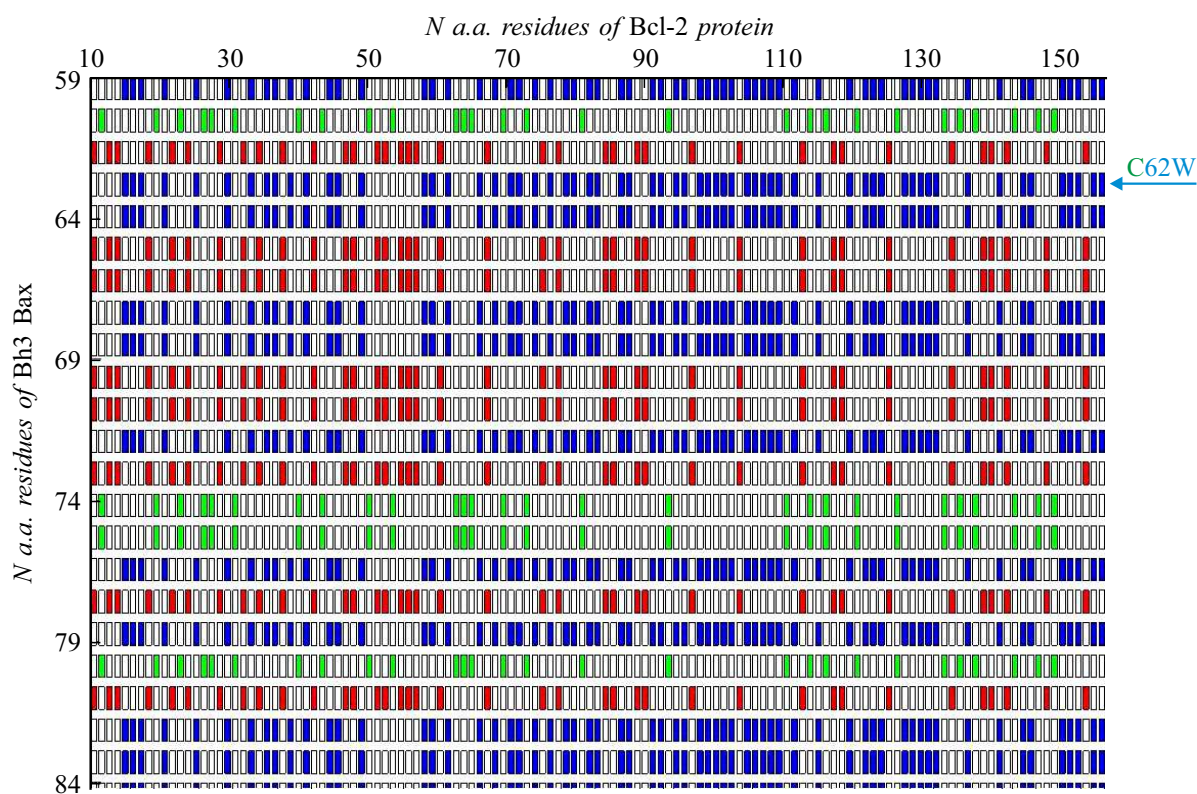
Ниже представлено трехмерное распределение потенциальной энергии электростатического взаимодействия полипептидных цепей двух белков ВНЗ-Вах<sub>(wt)</sub>–Vcl-2 (рис. 7).

Данное представление мы решили дополнить трехмерным графиком в зависимости от природы взаимодействующих а. а. При этом высота бара отвечает величине потенциальной энергии электростатического взаимодействия двух а. а. (рис. 8, 9).

Анализируя полученные значения потенциальной энергии взаимодействия, мы видим, что большинство



**Рис. 5.** Карта различных взаимодействий биологического комплекса  $BH3-Bax_{(wt)}-Bcl-2$ .



**Рис. 6.** Карта различных взаимодействий биологического комплекса  $BH3-Bax_{(m6)}-Bcl-2$ . Стрелкой указана строка, которая отвечает месту расположения введенной замены C62W.

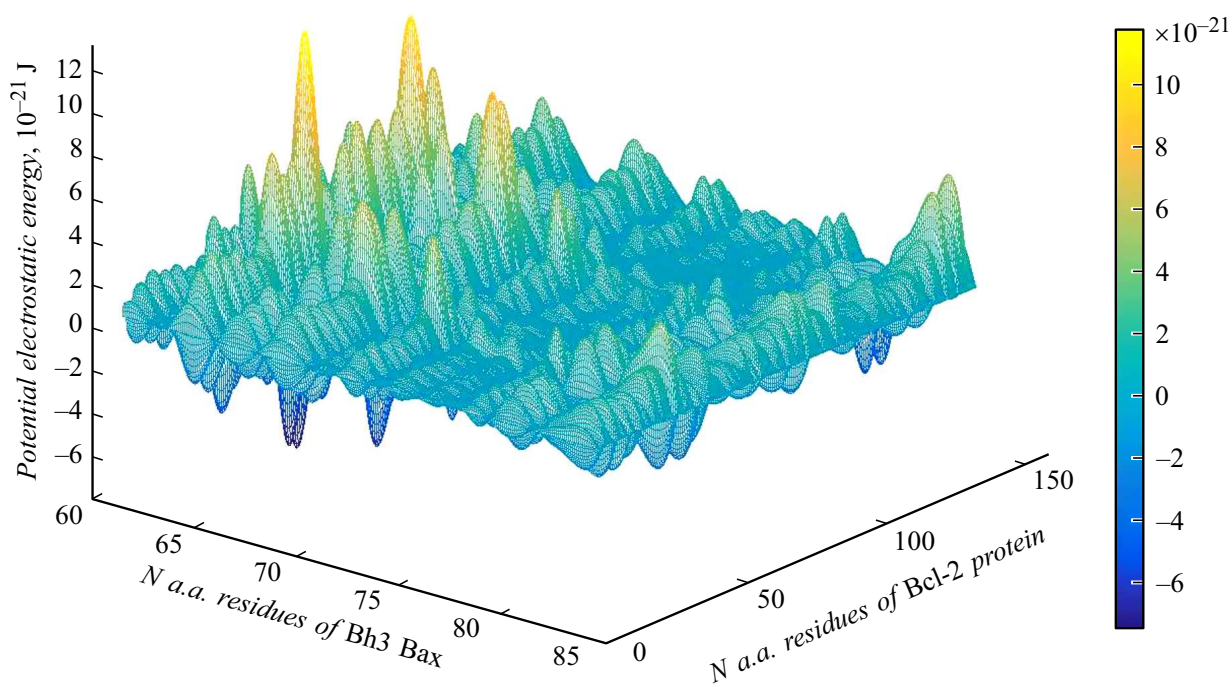


Рис. 7. График трехмерного представления потенциальной энергии взаимодействия  $BH3-Bax_{(wt)}-Bcl-2$ .

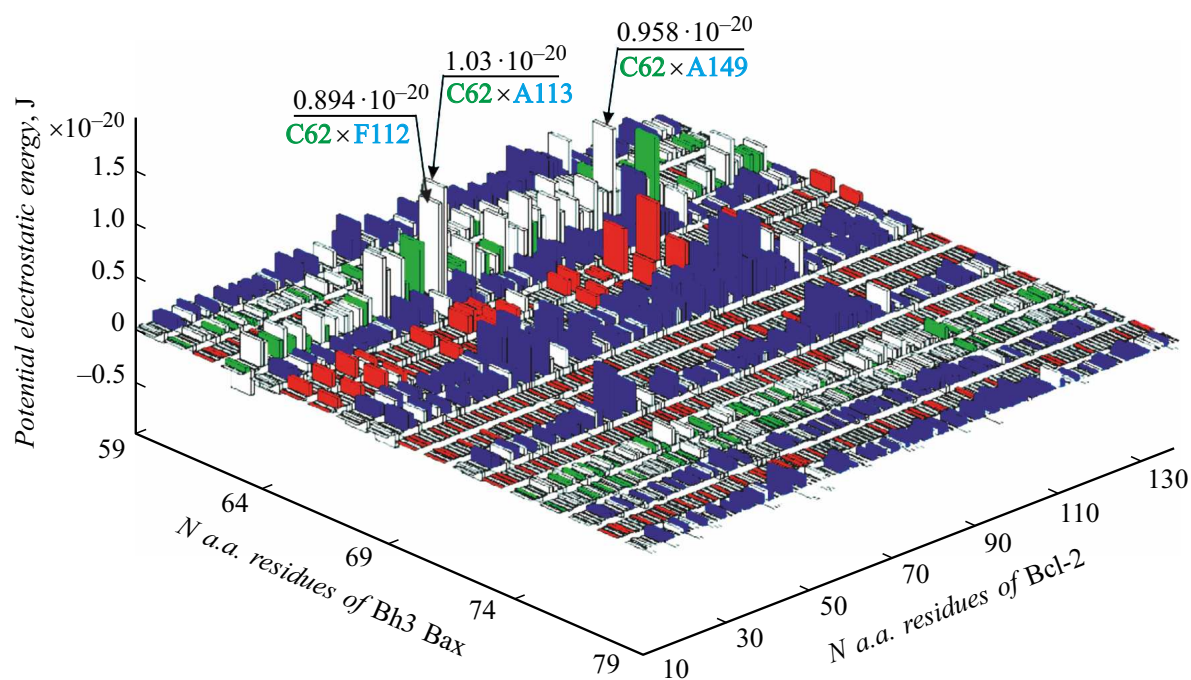


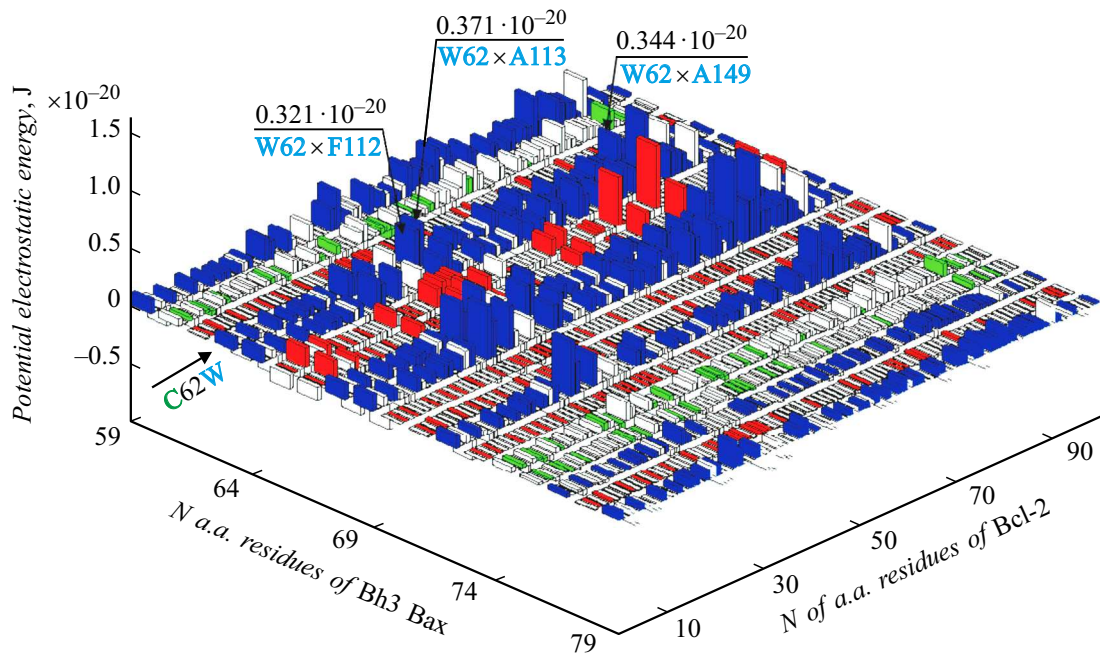
Рис. 8. Трехмерное представление потенциальной энергии электростатического взаимодействия  $BH3-Bax_{(wt)}-Bcl-2$  с указанием гидрофобных, гидрофильных взаимодействий заряженных а. а.

максимальных значений приходятся на CYS62 BH3 пептида Bax и на а.а. с 107 по 113 белка Bcl-2. Значения потенциальной энергии для некоторых мутаций в BH3 пептиде Bax при взаимодействии с Bcl-2 приведены в табл. 2, 3 в сравнении с  $BH3-Bax_{(wt)}$  при взаимодействии с Bcl-2.

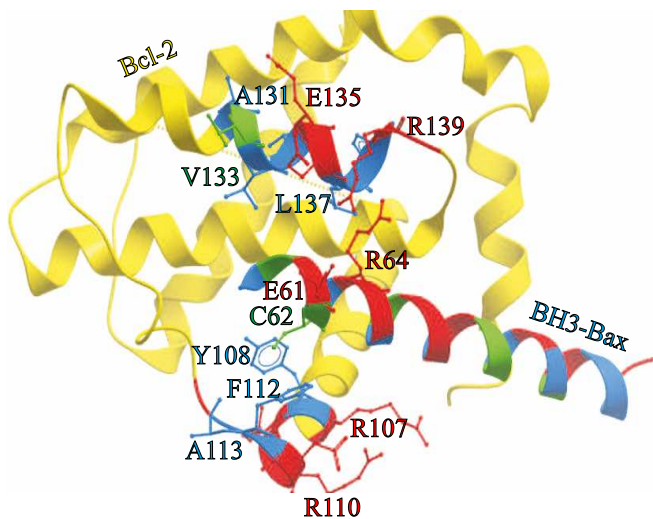
В приведенных табл. 2 и 3 отображены лишь некоторые а.а. белка Bcl-2 с 107 а.а. по 113 а.а. и с 131 а.а. по 140 а.а., которые находятся поблизости от замененных а.а. в BH3-Bax.

Трехмерный участок с указанием данных а.а. приведен на рис. 10.





**Рис. 9.** График трехмерного представления потенциальной энергии электростатического взаимодействия  $BH3-Bax_{(m6)}-Bcl-2$  с указанием гидрофобных взаимодействий, гидрофильных взаимодействий, заряженных а. а. Стрелкой указана строка, отвечающая замене C62W.



**Рис. 10.** Комплекс  $BH3-Bax-Bcl-2$  указанием а. а., приведенных в табл. 2 и 3.

Проведем сравнительный анализ полученных значений табл. 2 для  $BH3-Bax_{(wt)}-Bcl-2$  и  $BH3-Bax_{(m1)}-Bcl-2$ .

Из табл. 2 видно, что при замене глутаминовой кислоты на аланин происходит существенное повышение показателя степени значения потенциальной энергии электростатического взаимодействия.

Перейдем к анализу полученных данных при взаимодействии  $BH3-Bax_{(m2)}-Bcl-2$ . При замене аргинина 64 на аланин изменение порядка степени значения потенциальной энергии взаимодействия не произошло,

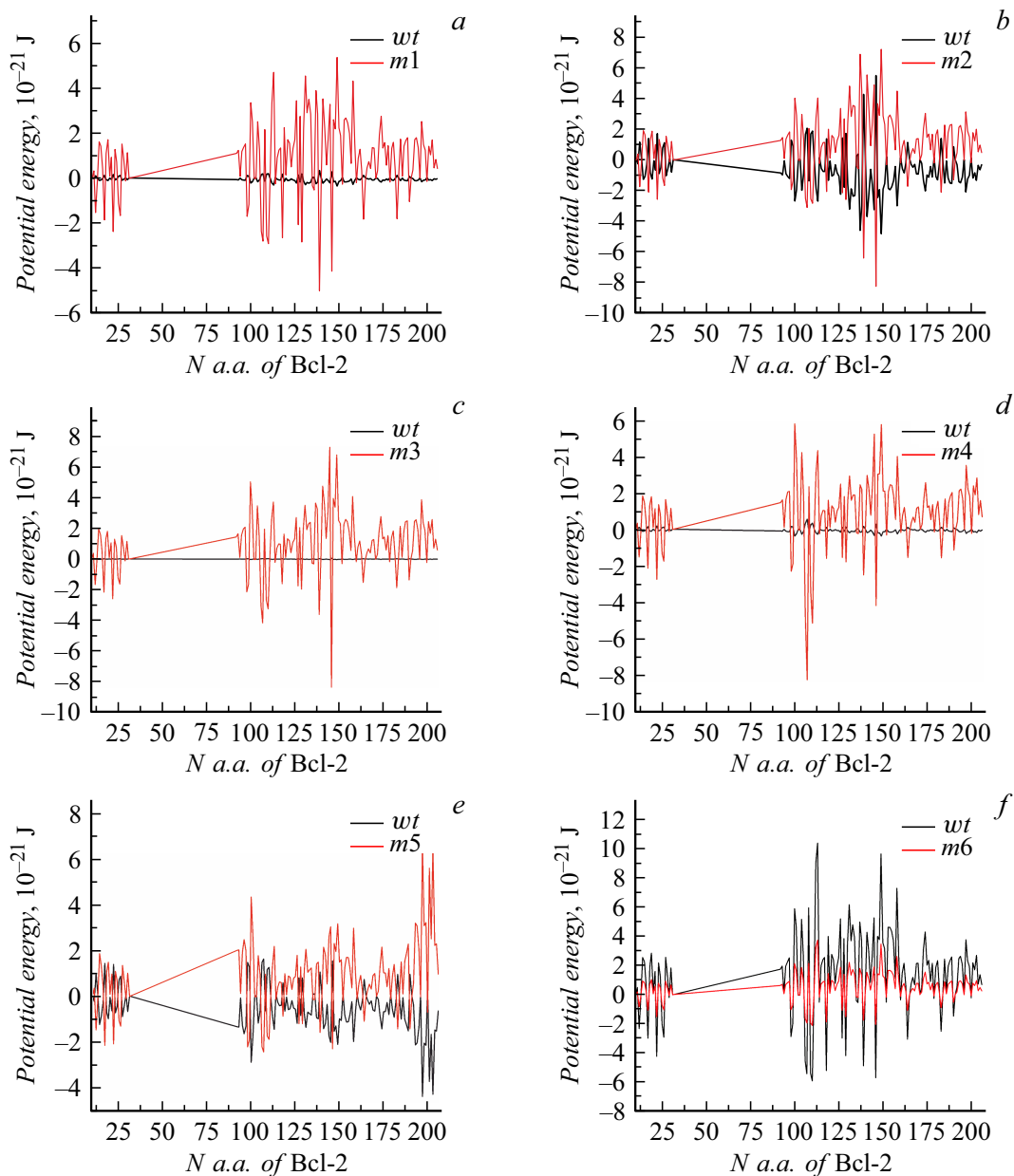
однако после замены аргинина на глутамин, значения потенциальной энергии в выбранном диапазоне поменяли знак (с положительного на отрицательный и наоборот), а также увеличились абсолютные значения потенциальной энергии для выбранного диапазона а. а. белка Bcl-2 (табл. 2). В случае „m1“ и „m2“ мы видим увеличение абсолютных значений потенциальной энергии по сравнению с  $BH3-Bax_{(wt)}$ .

Перейдем к анализу взаимодействия  $BH3-Bax_{(m6)}$  с Bcl-2 при замене гидрофильного цистеина на гидрофобный триптофан. Как видно из табличных данных, значения потенциальной энергии электростатического взаимодействия значительно снизились. В случае „m6“ мы наблюдаем обратную тенденцию: уменьшение абсолютных значений потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия по сравнению с Bcl-2 при взаимодействии с  $BH3-Bax_{(wt)}$ .

Анализ данных табл. 3 демонстрирует схожую тенденцию, а именно замена а. а., которые приводят к увеличению  $K_d$ , характеризуются так же и большими абсолютными значениями потенциальной энергии электростатического взаимодействия по сравнению со взаимодействием пептида дикого типа Bax с белком Bcl-2.

Для более детального анализа полученных данных рассмотрим графики разброса значений потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия по всей длине полипептидной цепи белка Bcl-2 (рис. 11, 12) и графики для области белка Bcl-2 с 130 по 140 а. а. для всех шести случаев мутаций (табл. 1).

Анализ полученных кривых  $BH3-Bax_{(wtE61)}-Bcl-2$  и  $BH3-Bax_{(m1)}-Bcl-2$  (рис. 11 а, 12, а) указывает на боль-



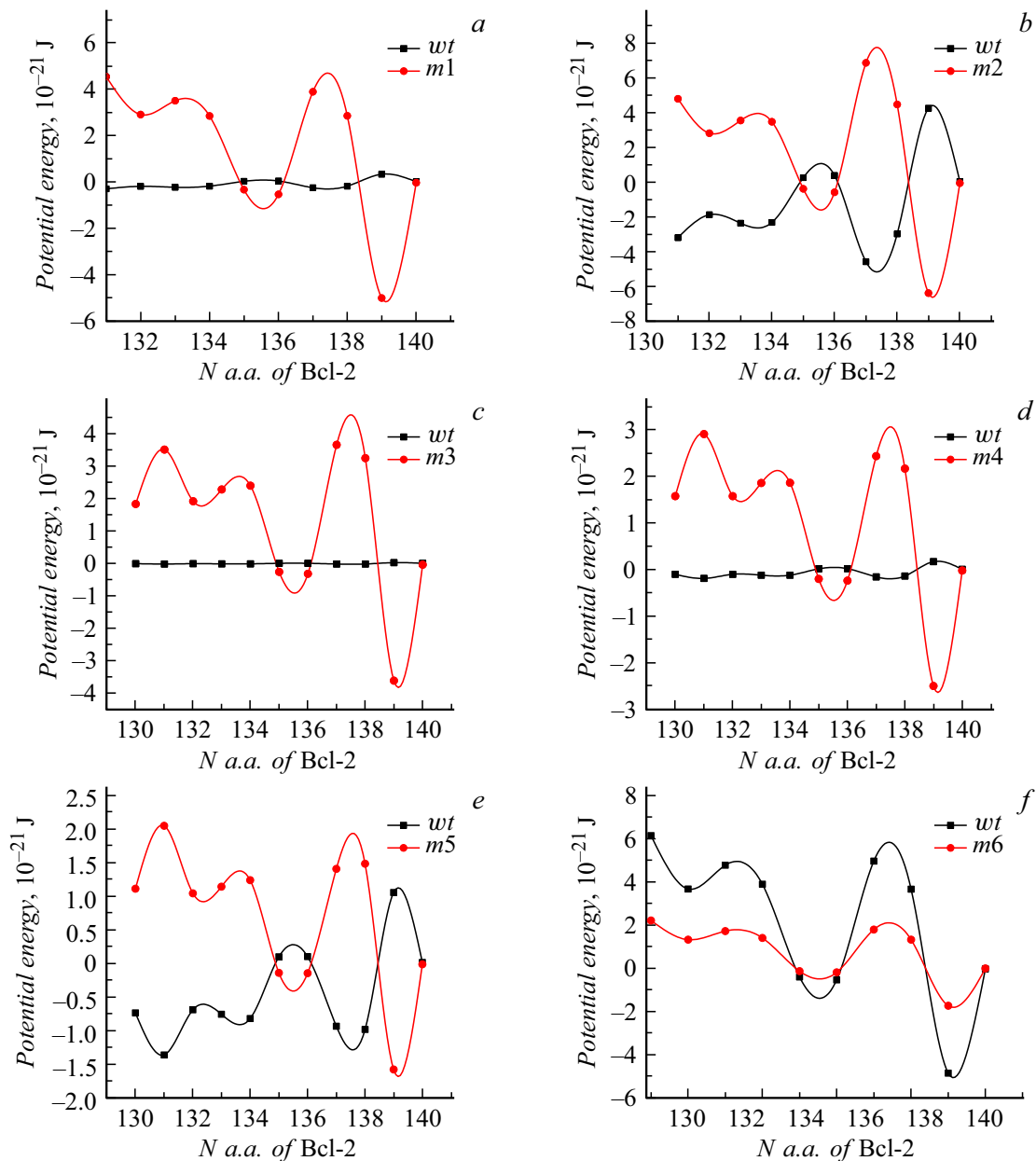
**Рис. 11.** Графики флуктуации потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия, вычисленные для белковых комплексов ВН3-Вах<sub>(wtE61)</sub>-Всl-2 и ВН3-Вах<sub>(m1)</sub>-Всl-2 (a), ВН3-Вах<sub>(m2)</sub>-Всl-2 и ВН3-Вах<sub>(wtR64)</sub>-Всl-2 (b), ВН3-Вах<sub>(m3)</sub>-Всl-2 и ВН3-Вах<sub>(wtD68)</sub>-Всl-2 (c), ВН3-Вах<sub>(m4)</sub>-Всl-2 и ВН3-Вах<sub>(wtE69)</sub>-Всl-2 (d), ВН3-Вах<sub>(m5)</sub>-Всl-2 и ВН3-Вах<sub>(wtR76)</sub>-Всl-2 (e), ВН3-Вах<sub>(m6)</sub>-Всl-2 и ВН3-Вах<sub>(wtC62)</sub>-Всl-2 (f).

шую вариабельность кривой ВН3-Вах<sub>(m1)</sub>-Всl-2 по сравнению с кривой ВН3-Вах<sub>(wtE61)</sub>-Всl-2, при этом кривые ВН3-Вах<sub>(wtR64)</sub>-Всl-2 и ВН3-Вах<sub>(m2)</sub>-Всl-2 (рис. 11 b и 12, b) демонстрируют примерно одинаковый колебательный характер. Так же примерно одинаковый по амплитуде колебательный характер кривых демонстрируют графики ВН3-Вах<sub>(wtR76)</sub>-Всl-2 и ВН3-Вах<sub>(m5)</sub>-Всl-2 (рис. 11, e, 12, e).

Большие колебания демонстрируют кривые взаимодействия ВН3-Вах<sub>(m3)</sub>-Всl-2 и ВН3-Вах<sub>(m4)</sub>-Всl-2 по сравнению с колебаниями кривых белка дикого типа

ВН3-Вах<sub>(wtR68)</sub>-Всl-2 и ВН3-Вах<sub>(wtE69)</sub>-Всl-2 соответственно, (рис. 11, c, 12, c).

Для графика ВН3-Вах<sub>(wtC62)</sub>-Всl-2 и ВН3-Вах<sub>(m6)</sub>-Всl-2 (рис. 11, f, 12, f) нет полученной экспериментальной величины  $K_d$ , однако мы предположили, что замена гидрофильного цистеина на гидрофобный триптофан может снизить силы отталкивания данной области  $\alpha$ -спирали ВН3 пептида белка Вах из гидрофобной канавки белка Всl-2. Поскольку взаимодействие Всl-2-ВН3-Вах осуществляется за счет присоединения амфифильной  $\alpha$ -спирали ВН3-Вах к гидрофобной канавке, образованной



**Рис. 12.** Графики для выбранных областей флуктуации потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия, вычисленные для белковых комплексов  $\text{ВНЗ-VaX}_{(wtE61)}\text{-Bcl-2}$  и  $\text{ВНЗ-VaX}_{(m1)}\text{-Bcl-2}$  (a),  $\text{ВНЗ-VaX}_{(m2)}\text{-Bcl-2}$  и  $\text{ВНЗ-VaX}_{(wtR64)}\text{-Bcl-2}$  (b),  $\text{ВНЗ-VaX}_{(m3)}\text{-Bcl-2}$  и  $\text{ВНЗ-VaX}_{(wtD68)}\text{-Bcl-2}$  (c),  $\text{ВНЗ-VaX}_{(m4)}\text{-Bcl-2}$  и  $\text{ВНЗ-VaX}_{(wtE69)}\text{-Bcl-2}$  (d),  $\text{ВНЗ-VaX}_{(m5)}\text{-Bcl-2}$  и  $\text{ВНЗ-VaX}_{(wtR76)}\text{-Bcl-2}$  (e),  $\text{ВНЗ-VaX}_{(m6)}\text{-Bcl-2}$  и  $\text{ВНЗ-VaX}_{(wtC62)}\text{-Bcl-2}$  (f).

белком Bcl-2. При этом взаимодействие S62VaX и F112, A113 Bcl-2 характеризуется максимальными значениями в положительной области потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия, и это можно трактовать как процесс отталкивания между гидрофильным а. а. VaX и гидрофобными а. а. Bcl-2.

Анализ поведения кривых указывает, что  $\text{ВНЗ-VaX}_{(wtC62)}\text{-Bcl-2}$  имеет более выраженный колебательный характер по сравнению с  $\text{ВНЗ-VaX}_{(m6)}\text{-Bcl-2}$ , такое поведение может указывать на возможную устойчивость биологического комплекса  $\text{ВНЗ-VaX}_{(m6)}\text{-Bcl-2}$ .

Как следует из представленных графиков, наибольшие амплитуды флуктуаций по сравнению со взаимодействием  $\text{ВНЗ-VaX}_{(wt)}\text{-Bcl-2}$  наблюдаются при взаимодействии  $\text{ВНЗ-VaX}_{(m3)}\text{-Bcl-2}$ .

Мы предполагаем, что при помещении а. а. в гидрофобный карман (табл. 4), состоящий из других а. а., внутри кармана останется тот а. а., у которого разброс значений потенциальной энергии при взаимодействии с карманом будет наименьшим. Для получения численной оценки этого взаимодействия оценим изменение энтропии ( $\Delta H$ , где  $H$  — энтропия)

Таблица 4. Значения  $K_d$  и  $\lg(\text{cond}(W))$

ВНЗ-Вах	$K_d$ нМ	Направление	$\lg(\text{cond}(W))$	Направление
wt	15.1	Направление изменения значения	5.133	Направление изменения значения
m5	57.1	↑	5.133	↑
m1	95.3	↑	5.149	↑
m2	129	↑	5.143	↑
m4	476	↑	5.153	↑
m3	1040	↑	5.156	↑

и разницу между среднеквадратическим отклонением ( $\Delta\sqrt{D}$ , где  $D$  — дисперсия) для данной замены а.а. и среднеквадратическим отклонением а.а. белка дикого типа в гидрофобном кармане. Отметим, что мерой флуктуации является стандартное отклонение от среднего значения, а также среднеквадратическое отклонение оказывается более удобной характеристикой варьирования, чем дисперсия, так как выражается в тех же единицах, что и средняя арифметическая величина.

Определим изменение энтропии для всех шести случаев мутаций и а.а. белка дикого типа.

С этой целью предварительно сформулируем некоторые теоретические положения.

В [16] показано, что если даны две непрерывные случайные величины  $X_1, X_2$ , описываемые однотипными законами распределения с плотностями  $f_1(x) = f(x, \mu_1, \lambda_1), f_2(x) = f(x, \mu_2, \lambda_2)$ , где  $\mu_i, \lambda_i$  — параметры сдвига и масштаба, где  $i = 1, 2$ , то

$$f(x, \mu_2, \lambda_2) = \frac{\lambda_1}{\lambda_2} f\left[\frac{\lambda_1}{\lambda_2}x - \frac{\lambda_1}{\lambda_2}\mu_2 + \mu_1, \mu_1, \lambda_1\right]. \quad (4)$$

Тогда по аналогии с [17] докажем следующую теорему.

**Теорема.** Пусть даны две непрерывные случайные величины  $X_1, X_2$ , определенные на всей числовой оси и описываемые однотипными законами распределения с плотностями  $f_1(x) = f(x, \mu_1, \lambda_1), f_2(x) = f(x, \mu_2, \lambda_2)$ . Зададим для случайных величин  $X_1, X_2$  в качестве параметра сдвига  $\mu_i$  их математические ожидания  $\mu_i = a_i$ , а в качестве параметра масштаба — средние квадратические отклонения  $\lambda_i = \sigma_i, i = \overline{1, 2}$ . Тогда разность дифференциальных энтропий случайных величин  $X_1, X_2$  равна

$$\Delta H = H(X_2) - H(X_1) = \lg\left[\frac{\sigma_2}{\sigma_1}\right].$$

**Доказательство [17].**

$$\begin{aligned} \Delta H &= - \int_{-\infty}^{\infty} f(x, a_2, \sigma_2) dx \\ &- \left[ - \int_{-\infty}^{\infty} f(x, a_1, \sigma_1) \ln f(x, a_1, \sigma_1) dx \right] \\ &= - \int_{-\infty}^{\infty} f(x, a_2, \sigma_2) dx + \int_{-\infty}^{\infty} f(x, a_1, \sigma_1) \ln f(x, a_1, \sigma_1) dx. \end{aligned}$$

Согласно выражению (4) имеем

$$\begin{aligned} &- \frac{\sigma_1}{\sigma_2} \int_{-\infty}^{\infty} f\left[\frac{\sigma_1}{\sigma_2}(x - a_2) + a_1, a_1, \sigma_1\right] \\ &\times \ln\left[\frac{\sigma_2}{\sigma_1} f\left[\frac{\sigma_1}{\sigma_2}(x - a_2) + a_1, a_1, \sigma_1\right]\right] dx \\ &+ \int_{-\infty}^{\infty} f(x_1, a_1, \sigma_1) \ln f(x_1, a_1, \sigma_1) dx \\ &= - \ln \frac{\sigma_1}{\sigma_2} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, a_1, \sigma_2) dx \\ &- \int_{-\infty}^{\infty} f(\alpha_1, a_1, \sigma_1) \ln(\alpha_1, a_1, \sigma_1) d\alpha \\ &+ \int_{-\infty}^{\infty} f(x, a_1, \sigma_1) \ln f(x, a_1, \sigma_1) dx, \\ &\alpha = \frac{\sigma_1}{\sigma_2}x - \frac{\sigma_1}{\sigma_2}a_2 + a_1. \end{aligned}$$

Тогда

$$\Delta H = - \ln \frac{\sigma_1}{\sigma_2} + H(X_1) - H(X_1) = - \ln\left[\frac{\sigma_1}{\sigma_2}\right] = \ln\left[\frac{\sigma_2}{\sigma_1}\right]$$

с учетом

$$\int_{-\infty}^{\infty} f(x, a_2, \sigma_2) dx = 1.$$

Итак, разность дифференциальных энтропий двух случайных величин  $X_1, X_2$ , которые описываются однотипными законами распределения с плотностями  $f_1(x) = f(x, a_1, \sigma_1), f_2(x) = f(x, a_2, \sigma_2)$ , где  $a_i$  — математические ожидания,  $\sigma_i$  — средние квадратические отклонения для случайных величин  $X_1, X_2, i = \overline{1, 2}$ , определяется как

$$\Delta H = \ln\left[\frac{\sigma_2}{\sigma_1}\right]. \quad (5)$$



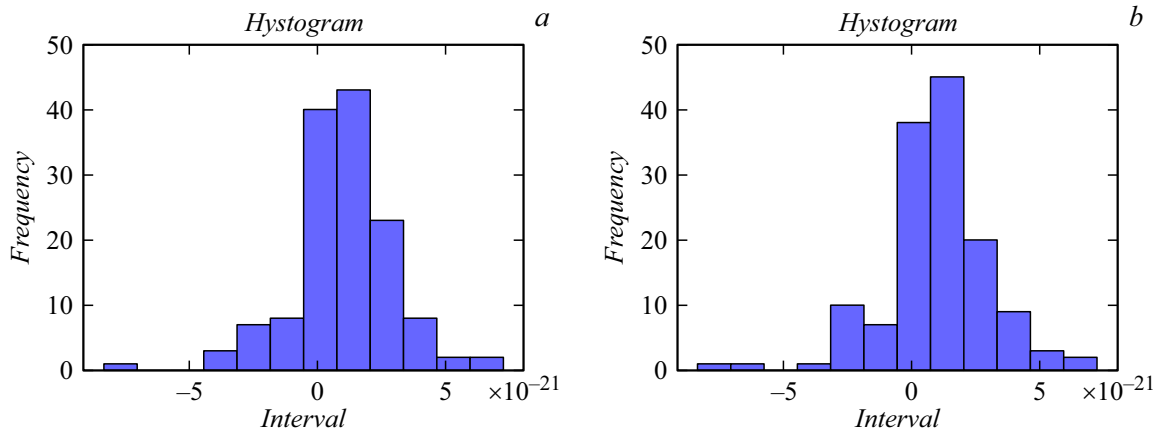


Рис. 13. Гистограммы для выбранных областей белков Vh3-Vax<sub>(wtD68)</sub>-Vcl-2 (a), Vh3-Vax<sub>(wtE69)</sub>-Vcl-2 (b).

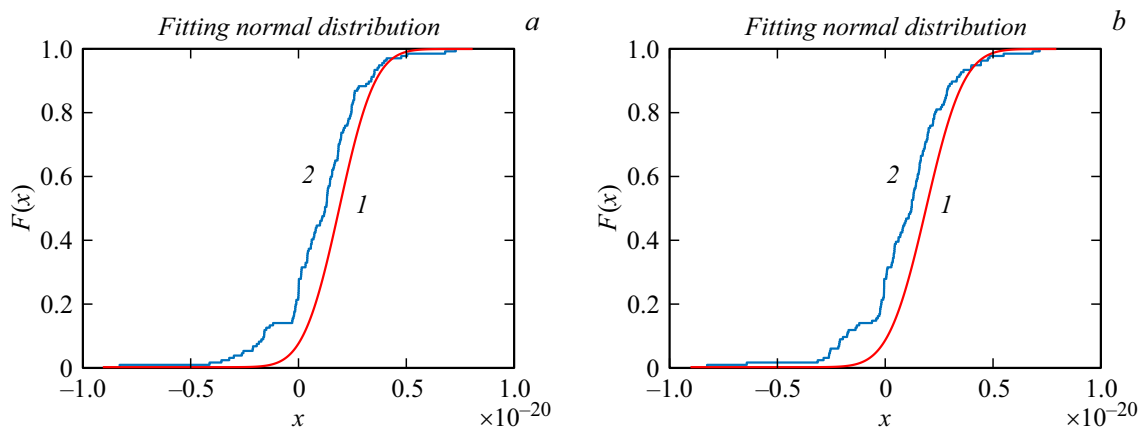


Рис. 14. 1 — график выборочной функции распределения, 2 — теоретическая функция распределения.

Таким образом, разность энтропий однопиковых распределений зависит только от параметров масштаба  $\lambda_1, \lambda_2$  (средние квадратические отклонения), т.е. сдвиг (математическое ожидание) никак не влияет ни на саму энтропию, ни на ее изменение. Это означает, что для разности энтропий однопиковых распределений операцию сдвига можно не учитывать [18].

Построим для примера гистограммы распределения частот потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия для белковых комплексов, определенных в табл. 1 для белков типа Vh3-Vax<sub>(wtD68)</sub>-Vcl-2, Vh3-Vax<sub>(wtE69)</sub>-Vcl-2 (рис. 13) и для большей наглядности покажем на одном рисунке выборочную и теоретическую функции распределения (в данном случае функцию Гаусса) см. рис. 14.

Как следует из рис. 14, распределение частот может быть приближенно описано в рамках нормального закона распределения с функцией плотности

$$f(x, a, \sigma) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-(x-a)^2/2\sigma^2}, \quad (6)$$

где параметр  $a$  — математическое ожидание (среднее значение), параметр  $\sigma$  — среднее квадратическое отклонение ( $\sigma^2$  — дисперсия) распределения.

При этом дифференциальная энтропия функции вида (6) будет иметь вид

$$H = \ln [\sigma\sqrt{2\pi e}]. \quad (7)$$

Из (7) следует, что энтропия зависит от среднего квадратического отклонения  $\sigma$ . Этот результат соответствует физическому представлению, так как неопределенность случайной величины тем выше, чем больше степень разброса ее возможных значений вокруг математического ожидания, т.е. чем больше дисперсия  $\sigma^2$ . Это значит, что рост  $\sigma$  неизбежно приведет к увеличению энтропии. Отметим, что характерной особенностью теплового движения молекул является его хаотичность, беспорядочность. Состояния молекулярной системы называются беспорядочными (или случайными), если они осуществляются большим (в пределе бесконечно большим) числом способов, и упорядоченными, если они осуществляются относительно малым числом способов. Число способов, которым может быть осуществлено то или иное макросостояние, есть его статистический вес. Поэтому состояния с большим статистическим весом будут беспорядочными, а состояния с малым статистическим весом — упорядоченными. Тогда из

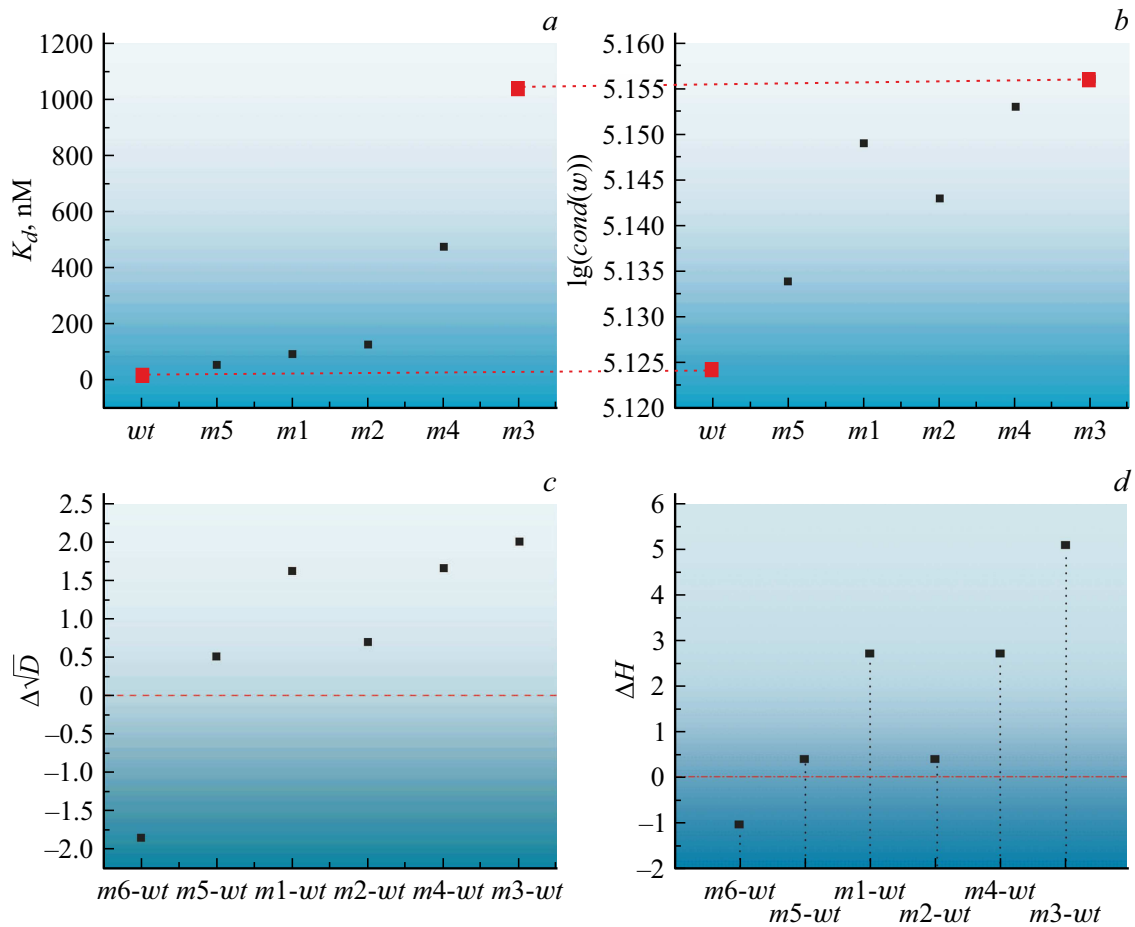


Рис. 15. График экспериментальной величины  $K_d$  (a), график  $\lg(\text{cond}(W))$  (b), график  $\Delta\sqrt{D}$  (c), график  $\Delta H$  (d).

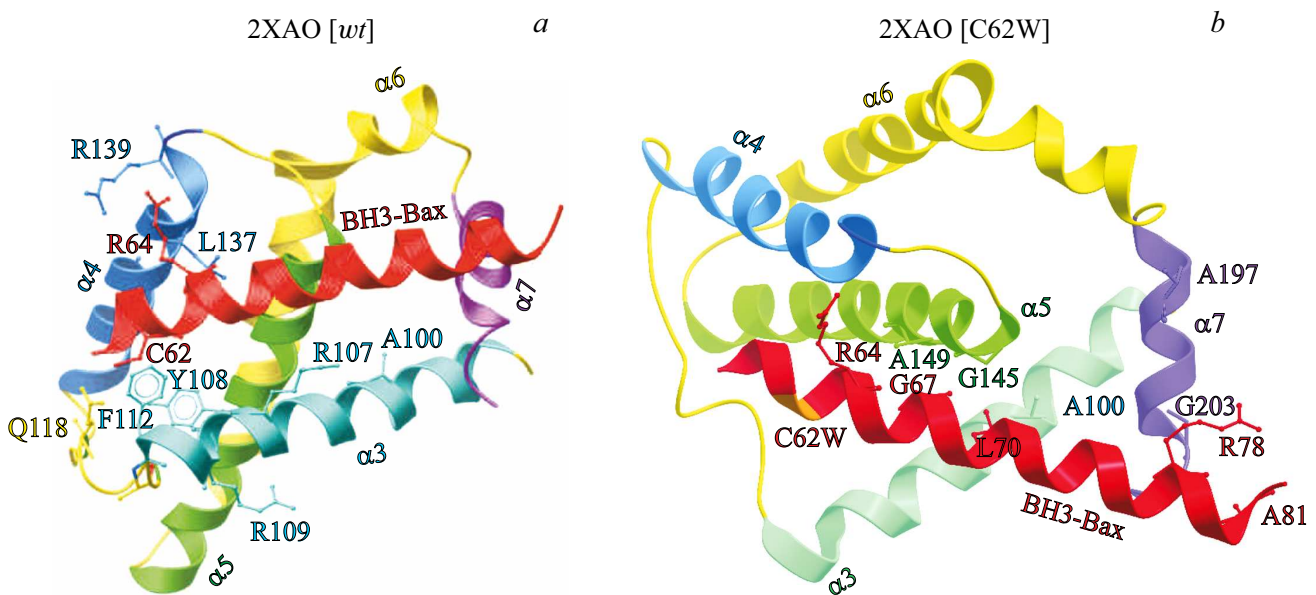


Рис. 16. Трехмерная структура с указанием а.а., на которые приходится больше по модулю значения потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия в случае  $\text{BH3-Bax}_{(wt)}-\text{Bcl-2}$  и  $\text{BH3-Bax}_{(m6)}-\text{Bcl-2}$ .

формулы Больцмана

$$H = k \cdot \ln(P),$$

(где  $k = R/N_a$ ,  $R = 8.31 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$ ) — молярная газовая постоянная,  $N_a = 6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  — число Авогадро;  $P$  — статистический вес, число способов осуществления данного состояния) следует, что беспорядочным состояниям отвечает большое значение энтропии, а упорядоченным — малое значение энтропии. Следовательно, энтропия — это мера беспорядка, нестабильности молекулярной системы.

При этом мера изменения упорядоченности ( $\Delta H$ ) для всех шести случаев мутаций и а.а. белка дикого типа с учетом выражений (5) и (7) будет иметь вид

$$\Delta H = \ln \left[ \frac{\sigma_i}{\sigma_{wt}} \right]$$

где  $i = \overline{1, 6}$ ,  $i$  — номер мутации а.а.

Как было отмечено выше, энтропия системы тем выше, чем больше степень неупорядоченности системы. При этом если процесс идет в направлении увеличения неупорядоченности системы, то величина  $\Delta H$  положительная, если  $\Delta H < 0$ , то в этом случае степень упорядоченности увеличивается относительно а.а. белка дикого типа.

Таким образом, в гидрофобном кармане белка с большей вероятностью остается тот а.а., у которого значение величины  $\Delta\sqrt{D}$  будет меньше, а степень упорядоченности высокая, т.е.  $\Delta H < 0$ .

Рассмотрим графики (см. рис. 15 *b, c* и *d*). Из них следует, что наблюдается качественное соответствие с ранее введенным критерием, определенным выражением вида (3), который характеризует степень устойчивости конфигурации биологического комплекса и величин  $\Delta\sqrt{D}$  и  $\Delta H$ , которые определены выше.

Также были проанализированы экспериментальные результаты изменения аффинности при замене а.а. пептида ВНЗ домена белка Вах на аланин при его связывании с Vcl-2. На представленных ниже графиках мы будем располагать данные а.а. замены по мере увеличения  $K_d$  (от меньшего значения к большему (табл. 1). При этом последовательность на графиках будет выглядеть следующим образом: ВНЗ-Вах<sub>(wt)</sub>, ВНЗ-Вах<sub>(m5)</sub>, ВНЗ-Вах<sub>(m1)</sub>, ВНЗ-Вах<sub>(m2)</sub>, ВНЗ-Вах<sub>(m4)</sub>, ВНЗ-Вах<sub>(m3)</sub>.

Значения следующих трех графиков  $\lg(\text{cond}(W))$  и  $\sqrt{D}$ ,  $\Delta H$  располагаются в таком же порядке, как и значения для  $K_d$ . При этом последний график содержит значение, полученное при взаимодействии ВНЗ-Вах<sub>(m6)</sub>-Vcl-2, на графике данное взаимодействие обозначено „m6“.

Мы предполагаем, что „m6“ характеризуется большей устойчивостью биологического комплекса, по сравнению со всеми остальными взаимодействиями: „wt“, „m1“ — „m5“.

Из рис. 15, *a, b* и табл. 4 следует, что результаты модельного расчета для минимального и максимального

значений вычисленной величины  $\lg(\text{cond}(W))$  и экспериментально определенной константой диссоциации ( $K_d$ ) хорошо согласуются между собой.

Таким образом, на основе построенной математической модели возможно теоретически подбирать замены ключевых а.а., которые будут характеризоваться наименьшей и наибольшей аффинностью к целевым белкам на основе построенной физической модели.

Проведенный анализ полученных результатов также позволил идентифицировать перераспределение максимумов потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия при заменах а.а. ВНЗ-Вах при взаимодействии с Vcl-2.

На рис. 16 приведены две такие структуры для белка дикого типа (wt) и „m6“ с указанием а.а. со стороны двух полипептидных участков белков Вах и Vcl-2, на которые приходится наибольшие значения потенциальной энергии попарного электростатического взаимодействия.

## Выводы

В настоящей работе разработан абсолютно новый метод, который позволит синтезировать пептиды с заданными физико-химическими свойствами, например, с высокой аффинностью к одному целевому белку, добиваясь низкой аффинности к другим белкам, тем самым добиваясь точечной терапевтической избирательности при лечении различных патологий.

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

1. Определена устойчивость белковых комплексов при точечных заменах а.а. с учетом трехмерной структуры биокомплекса, на основе введенного показателя: число обусловленности попарного электростатического взаимодействия потенциальной энергии а.а.

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

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

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

4. Полученные теоретические результаты находятся в хорошем согласии с проведенными экспериментами по выявлению изменению константы диссоциации  $K_d$  при заменах заряженных а.а. ВНЗ пептида белка Вах на аланин [15].

5. Критерий стабильности белкового комплекса ( $\lg(\text{cond}(W))$ ) попарного электростатического взаимодействия потенциальной энергии а.а., позволяет оценить диапазон разброса значений  $K_d$  и указывать какие мутации в пептидах будут приводить к увеличению/уменьшению стабильности биологического комплекса при их связывании с целевыми белками. Таким образом, перед проведением дорогостоящего трудоемкого эксперимента, когда необходимо синтезировать высокоселективный пептид, который будет характеризоваться высокой аффинностью к одному белку и низкой аффинностью к другому белку, разработанный нами метод позволит свести к минимуму количество проводимых экспериментов по поиску такого пептида, путем теоретического расчета заданного диапазона для высоких и низких значений  $K_d$ .

6. Разработанный в работе биофизический подход позволяет качественно определять ключевые а.а. при взаимодействии двух полипептидных цепей, а так же оценивать диапазон изменения  $K_d$  при замене ключевых а.а. в пептидах при их связывании с белком-мишенью.

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

Работа выполнена с целью разработки теоретических основ метода создания высокоселективных пептидов к целевым белкам.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] Yoshihiro Yoshitake, Daiki Fukuma, Akira Yuno, Masatoshi Hirayama, Hideki Nakayama, Takuya Tanaka, Masashi Nagata, Yasuo Takamune, Kenta Kawahara, Yoshihiro Nakagawa, Ryoji Yoshida, Akiyuki Hirotsue, Hidenao Ogi, Akimitsu Hiraki, Hirofumi Jono, Akinobu Hamada, Koji Yoshida, Yasuharu Nishimura, Yusuke Nakamura, Masanori Shinohara. Phase II Clinical Trial of Multiple Peptide Vaccination for Advanced Head and Neck Cancer Patients Revealed Induction of Immune Responses and Improved OS // Clin. Cancer Res. 2015. Vol. 21. N 2. P. 312–321.
- [2] Системная компьютерная биология/Коллектив авторов. Новосибирск: СО РАН, 2008. 769 с.
- [3] Betts M.J., Sternberg M.J. // Protein Eng. 1999. Vol. 12. P. 271–283.
- [4] Пырков Т.В., Озеров И.В., Балицкая Е.Д., Ефремов Р.Г. // Биоорганическая химия. 2010. Т. 36. № 4. С.482–492.
- [5] Morris R.J., Najmanovich R.J., Kahraman A., Thornton J.M. // Bioinformatics. 2005. Vol. 21. N 10. P. 2347–2355.
- [6] Демчук О.Н., Карпов П.А., Блом Я.Б. // Цитология и генетика. 2012. № 3. С. 55–64.
- [7] Haiming D., Meng X.W., Scott H., Kaufmann S.H. // Cancer Transl. Med. 2016. Vol. 2. N 1. P. 7–20.
- [8] Dewson G. // The Open Cell Signaling J. 2011. Vol. 3. P. 3–8.
- [9] Bhat V., Olenick M.B., Schuchardt B.J., Mikles D.C., McDonald C.B., Farooq A. // Biopolymers. 2014. Vol. 101. N 6. P. 573–582.
- [10] Protein data bank — URL: <https://www.rcsb.org/> (дата обращения 17.04.2019)
- [11] Fenley A.T., Adams D.A., Onufriev A.V. // Biophys. J. 2010. Vol. 99. N 5. P. 1577–1585.
- [12] Dijk E., Hoogeveen A., Abeln S. // PLOS Comput. Biol. P. 1–17.
- [13] Paige C.C. Van Dooren P. On the Quadratic Convergence of Kogbetliantz's Algorithm for Computing the Singular Value Decomposition. Linear Algebra and Its Applications. 1985. Vol. 77. P. 301–313.
- [14] Koshlan T.V., Kulikov K.G. Mathematical Modeling of Protein Complexes. Springer-Nature, 2018. P. 367.
- [15] Ku B., Liang C., Jung J.U., Oh B.H., Bonsu Ku., Chengyu L., Jae U.J., Byung-Ha O. // Cell Research. 2011. Vol. 21. P. 627–641.
- [16] Тырсин А.Н., Калев О.Ф., Яшин Д.А., Лебедева О.В. // Математическая биология и биоинформатика. 2015. Т. 10. № 1. С. 206–219.
- [17] Автореф. канд. дис. Лебедева О.В. Энтропийное моделирование динамики многомерных стохастических систем. Челябинск, 2015.
- [18] Cover T.M., Thomas J.A. Elements of Information Theory. NY.: Wiley, 1991. 563 p.