

# КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И ДАННЫЕ АТОМНО- СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

А.Толстова<sup>1,2</sup>, А.Протопопова<sup>1,2</sup>, И.Оферкин<sup>2</sup>, М.Годзи<sup>2</sup>  
sinitsyna@gmail.com

Одна из актуальных задач современной биофизики – изучение конформационных особенностей адсорбированных белковых структур *in vitro*. Экспериментальные методы не в состоянии в целом обеспечить требуемую точность исследований. Тем не менее, атомно-силовая микроскопия (АСМ) представляется наиболее перспективным методом для этих целей, прежде всего благодаря простоте и возможности визуализации широкого класса объектов.

АСМ имеет существенное значение для развития нанотехнологий. К достоинствам метода можно отнести, в частности, возможность сканирования объекта в режиме реального времени в естественных условиях, небольшое влияние этого процесса на образец (деформации носят обратимый характер), а также возможность получения информации о ее механических и электрических свойствах [1]. Однако наиболее важные задачи биофизики – вопросы конформационных преобразований биополимеров в процессе адсорбции – не могут быть решены только методом АСМ [2, 3]. Требуется привлечение теоретических методов для совместной трактовки данных. Наиболее подходящим для этого является компьютерное моделирование, а именно молекулярная динамика. Применение компьютерного моделирования сканируемых

объектов может дать исследователю новую информацию о характере связи биополимера с подложкой и о его трехмерной структуре в целом. В качестве недостатков следует отметить ограниченность баз данных структур, а также высокую ресурсоемкость метода.

Совместная трактовка данных АСМ и компьютерного моделирования о структуре биополимера открывает новые горизонты в изучении нанообъектов.

Для верификации предложенного подхода проведен ряд экспериментов с использованием АСМ: изучалась адсорбция специальных выбранных белков на различные поверхности, а затем в рамках метода молекулярной динамики строились модели этого процесса.

Метод тестировался на белке лизоциме массой 14.3 кДа [4]. В результате была получена серия изображений его адсорбции на слюде (рис.1).

Затем проводилась симуляция адсорбции лизоцима из водного раствора на поверхнос-

ти моделировавшего слюду оксида кремния (рис.2).

Для сравнения полученных в модели конформаций с экспериментальными данными осуществлено моделирование зондового сканирования при воспроизведении движения зонда с параметрами конкретного эксперимента АСМ, данные которого использовались для сравнения.

В результате был получен массив точек, записанных в

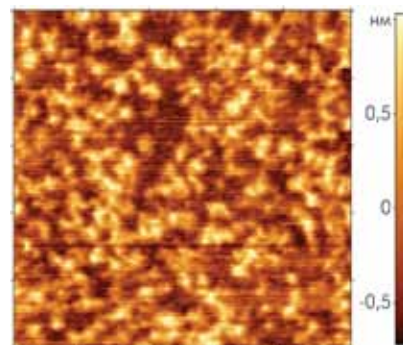


Рис.1. АСМ-изображение адсорбции лизоцима на слюде (концентрация 0,05 мг/мл)

<sup>1</sup> Центр перспективных технологий.

<sup>2</sup> МГУ им. М.В.Ломоносова, физический факультет.

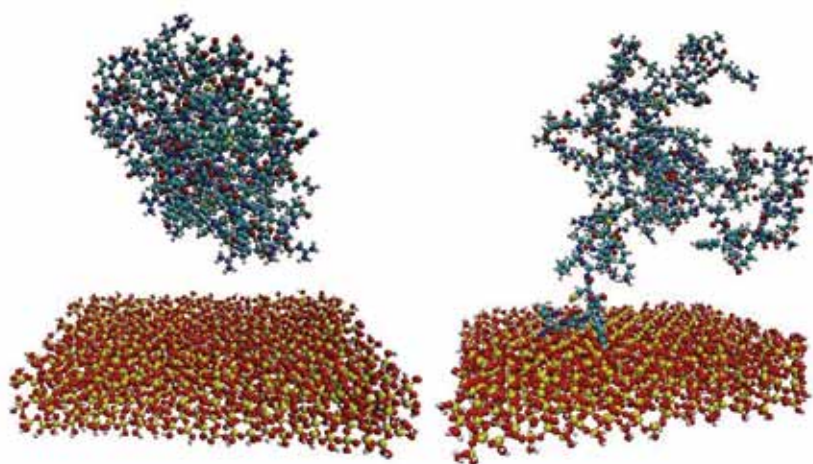


Рис.2. Симуляция адсорбции белка лизоцима на кварцевую подложку

виде сеточной двумерной функции высоты от горизонтальных координат, в которых проводилось измерение высоты, представляющей собой рельеф поверхности.

Данные АСМ также представляли собой двумерную сеточную функцию высоты от координат  $x$  и  $y$ . Посредством корреляционного анализа они сравнивались с данными модели (рис.3).

Была проведена апробация предложенного метода: построен опытный образец функционирующего программного модуля, осуществляющего моделирование адсорбции биополимера, зондового сканирования и сравнение результатов такого сканирования с данными реальной атомно-силового микроскопии тех же биополимеров. Используемая модель зондового сканирования требовала модификации, поскольку заложенные в нее данные не давали итогового совпадения реального и модельного рельефов. Тем не менее, полученные результаты позволили сделать вывод об обоснованности предложенного метода.

С целью получения репрезентативных экспериментальных данных было предложено использовать для исследования более крупный, чем лизоцим, объект, поскольку степень искажения при АСМ зависит именно от его размеров. В качестве последнего был выбран белок

фибриноген, участвующий в процессе свертывания крови и образовании фибриновых сгустков. Сведения о его взаимодействии с различными поверхностями имеют важное прикладное значение для имплантологии и изучения биосовместимости веществ. Он интересен также тем, что существенно меняет конформацию в зависимости от характера подложки. Исследовалась адсорбция фибриногена на гидрофильную слюду и гидрофобную подложку, образованную из покрытой гексаметилдисилазаном (HMDS) слюды (Рис.4).

Из рис.4 видно, что на гидрофильной поверхности белок сохраняет гантелеобразную форму, тогда как на гидрофобной происходит его частичная деградация и уплотнение. При этом высоты единичных молекул различались в среднем в два

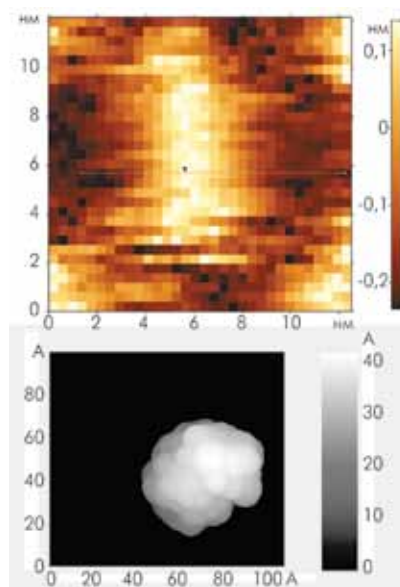


Рис.3. Сравнение данных АСМ и компьютерного моделирования

раза (на гидрофобной подложке фибриноген на 45% ниже).

Для подтверждения экспериментальных данных, как и в случае с лизоцимом, проведено моделирование адсорбции белка из водного раствора.

Несмотря на то, что адсорбция происходит в обоих случаях, характер взаимодействия белка с поверхностью (рис.5) существенно меняется в зависимости от ее вида. Можно выделить гидрофобные и гидрофильные домены, а также оценить высоту объектов. Для этого, как и в работе с лизоцимом, построено модельное АСМ-изображение фибриногена. Разница в высотах

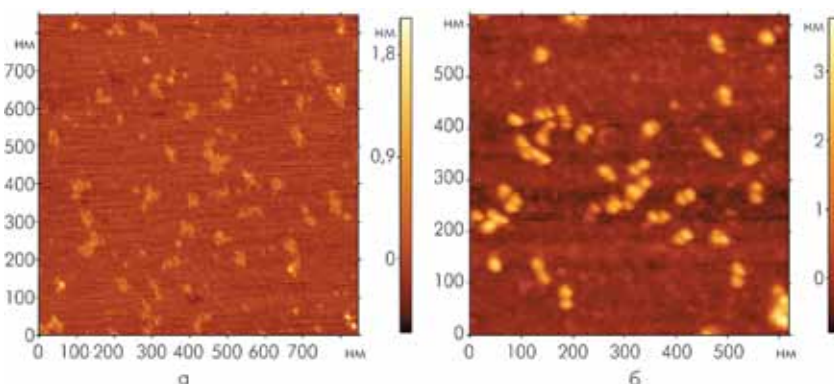


Рис.4. АСМ-изображения фибриногена: а – на HMDS-слюде, б – на слюде

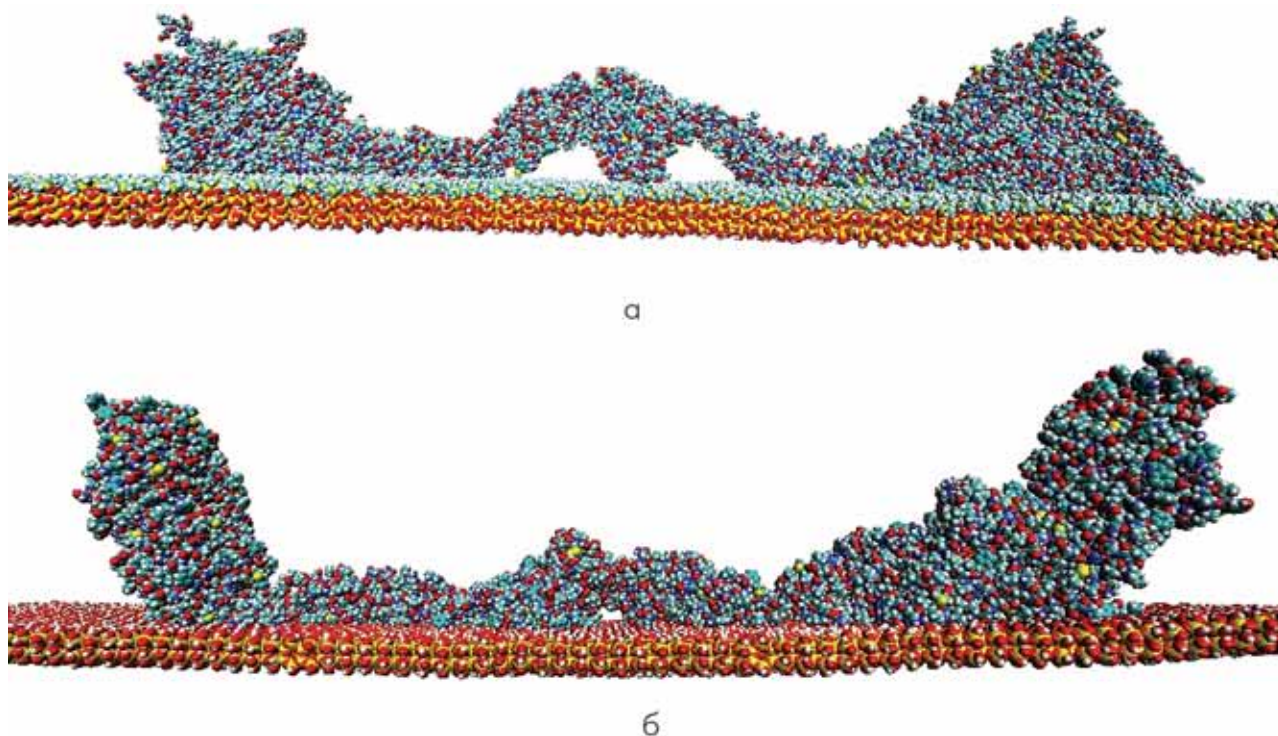


Рис.5. Конечные конформации фибриногена: а – на HMDS-слое, б – на слое

составила 27%, что меньше, чем в эксперименте. Однако в модели не учитывалось проминание образца в процессе его сканирования зондом, что и вносит искажения в высоты.

Полученные в модели количественные данные подтверждаются многочисленными публикациями по АСМ [5–7], одновременно дополняя их. Модельные данные не только подтвердили эксперимент, но и предоставили новую информацию о характере взаимодействия фибриногена с гидрофобными и гидрофильными поверхностями и о расположении гидрофобных и гидрофильных частей самой молекулы.

В перспективе предложенный метод может открыть следующие возможности:

- получение дополнительных данных о структуре исследуемого биополимера:
  - ◆ соотношение и природа действующих на зонд сил;
  - ◆ аминокислоты, связанные с подложкой;
  - ◆ сила связи биополимера с подложкой;
- свойства биополимера в растворе (размеры, заряд, функциональная активность);

- возможность исследований конформационных преобразований биополимеров *in vitro*;

- существенное улучшение точности зондовой микроскопии.

*Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (П255, П717, П973, №16.513.11.3021), НАТО – программа «Наука для мира» (CBN.NR.NRSFP 983204), Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (7713р/11277), грантом FP7 No 257511.*

#### Литература

1. **Matsko N.B.** Atomic force microscopy applied to study macromolecular content of embedded biological material. – *Ultramicroscopy*. – 2007, № 107 (23–), с.951–05.
2. **Schneider S.W., LaMermer J., Henderson R.M., Oberleithner H.** Molecular weights of individual proteins correlate with molecular volumes measured by atomic force microscopy. – *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. – 1998, № 435 (3), с.3623–67.
3. **Kiselyova O.I., Galyamov M.O., Nasikan N.S., Yaminsky I.V., Karpova O.V., Novikov V.K.**

Scanning probe microscopy of biomacromolecules: nucleic acids, proteins and their complexes. – *Frontiers of Multifunctional Nanosystems* (Eds. Buzanaeva E.V., Scharff P. – Kluwer Academic Publishers, Dordrecht), 2002, с. 3213–30.

4. **M.G.Godsie, A.P.Tolstova, and I.V.Oferkin.** Use of Molecular Dynamics Simulation in Interpreting the Atomic Force Microscopy Data. *Biophysics* 55(3) 2010, p.3703–76.

5. **D.J.Taatjes, A.S.Quinn, R.J.Jenny, P.Hale, E.G.Bovill, J.McDonagh,** Tertiary structure of the hepatic cell protein fibrinogen fluid revealed atomic force microscopy, *Cell Biol. Int.* 21, 1997, p.7157–26.

6. **R.E.Marchant, M.D.Barb, J.R.Shainoff, S.J.Eppell, D.L.Wilson, C.A.Siedlecki,** Three dimensional structure of human fibrinogen under aqueous conditions visualized by atomic force microscopy, *Thromb. Haemost.* 77, 1997, p.10481–051.

7. **A.Agnihotri, C.A.Siedlecki,** Time-dependent conformational changes in fibrinogen measured by atomic force microscopy, *Langmuir* 20, 2004, p.88468–852.