

МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ХИРАЛЬНОСТИ СПИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ**Шпигун Д.К., Луценко А.О., Сидорова А.Э.**

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: denish.den@mail.ru, aleksluchrus@yandex.ru,
sky314bone@mail.ru

Поступила в редакцию: 16.07.2021

Аннотация. В данной работе рассмотрены различные подходы к количественной оценке молекулярной хиральности – одной из актуальных проблем биохимической физики. Предложен новый, относительно простой, метод оценки хиральности спиральных структур белковых молекул. Метод основан на нахождении опорных точек – атомов альфа-углерода в полипептидной цепи и последующем расчете смешанных произведений векторов, соединяющих эти точки. Специальное внимание уделено нормировке хиральности спиральных белковых структур. Проанализировано 983 белков из 12 классов, (данные базы PDB). Показано, что, наряду с энергетически более выгодными правыми α - и 3_{10} -спиралями, среди исследованных белков имеются элементы вторичной структуры в левой конформации. На основании разработанного метода получена карта хиральности спиральных структур исследованных белков. Данный метод можно рассматривать как шаг к распространению понятия хиральности на иерархически вышестоящие категории объектов – белковые глобулы и надмолекулярные структуры.

Ключевые слова: белки, хиральность, альфа-углерод, α -спираль, 3_{10} -спираль, карта хиральности.

ВВЕДЕНИЕ

Хиральность как важнейшее свойство молекулярно-биологических систем является предметом активных фундаментальных исследований как в нашей стране, так и за рубежом [1-3]. Большое внимание уделяется решению задач, связанных с разработкой критериев и методов оценки хиральности биомолекул, а также выявлению зависимости «структура – биологическая активность». В.А. Твердисловым с коллегами разработана концепция иерархического структурообразования в макромолекулярных системах, согласно которой для природных белков прослеживается закономерное чередование знака хиральности структурных уровней L-D-L-D, начиная с левой структуры из аминокислотных остатков до четвертичной надмолекулярной структуры [4]. Эта концепция полностью соответствует современному взгляду на механизм образования пространственной конформации белка как многостадийного процесса, одной из стадий которого является формирование элементов вторичной структуры, в том числе различных спиральных форм (α -спиралей, 3_{10} -спиралей и др.), для которых наиболее энергетически выгодной является D-конформация [5,6]. Левозакрученные спирали встречаются реже и преимущественно в полипептидных цепях, содержащих много остатков глицина [7]. Следует отметить, что долгое время о левых спиралях в белках вообще мало что было известно. Лишь в 2005 г. шведские исследователи, впервые проведя детальный анализ множества спиралей с точки зрения частоты их встречаемости, длины, аминокислотного состава и стабильности, выявили более трех десятков L-спиралей, обозначив их важную структурно-функциональную роль [8]. Позднее, китайские ученые, проанализировав множество белковых структур, идентифицировали 72 левых α -спиралей и 812 левых 3_{10} -спиралей [9] и показали, что объективное знание о хиральности спиральных конформаций элементов вторичной структуры представляется крайне важным.

Обзор основных методов определения хиральности молекулярных структур.

Плоский характер и фиксированная длина пептидных связей предопределяют практически единственную возможность для сворачивания пептидной цепи путем поворота плоскостей пептидных связей относительно их связей с α -углеродными атомами. Такое вращение было описано двугранными углами ϕ (поворот плоскости, предшествующий данному α -углеродному атому – поворот вокруг связей N–C α) и ψ (поворот плоскости, следующий за данным α -углеродным атомом – поворот вокруг связей C α – C). Эта пара двугранных углов считается ключевым параметром при геометрической оценке хиральности белков методом Рамачандрана, позволяющим увидеть преобладающую конформацию элементов вторичной структуры биомолекул [10] и получившим широкое распространение. Однако оказалось, что возможно существование конформаций полипептидной цепи и вне разрешенных областей карты Рамачандрана, которая дает лишь частичную картину конформационного богатства белка.

Давно известно, что молекулярной хиральности может быть придан количественный смысл через специально параметризованные функции. Однако хиральность молекулярных структур как таковую очень сложно определить количественно. К настоящему времени предложено несколько подходов к решению этой проблемы.

В качестве первой меры хиральности была предложена так называемая функция хиральности, определяемая в соответствии с расстояниями от центра масс до плоскостей симметрии правильного тетраэдра или тригональной бипирамиды [12,13]. Согласно первым работам в области химии, посвященным оценке знака хиральности, любая мера хиральности геометрического объекта является псевдоскалярной (инвариантной при

правильных вращениях, но изменяющей знак при неправильных вращениях), и, в общем случае, молекула характеризуется бесконечным набором хиральных параметров [11]. В качестве основных методов оценки хиральности в области химии можно привести следующие: метод топологических индексов ветвления для алканов (в зависимости от определенных физических свойств молекул) [14] и метод двоичного кода для описания молекулярной формы и хиральности бензоидов, зависящий от направления обхода (зеркальные молекулы в виде 2D-графа обладают одинаковыми по модулю, но противоположными по знаку значениями «взвешенной атомной суммы» – меры хиральности) [14-16]. Методы оценки хиральности по Хаусдорффу основаны на совмещении исходной симметрии объекта с зеркальным образом в метрическом пространстве и расчете меры хиральности как минимального расстояния, разделяющего хиральный и ахиральный объекты [17]. Однако данные методы не позволяли однозначно определять знак хиральности.

Согласно М. Петижану [18], мера хиральности в трехмерном евклидовом пространстве должна удовлетворять следующим основным требованиям: иметь неограниченное количество точек в рассматриваемом пространстве, определяться для пространства любой размерности, не зависеть от способа зеркального отображения и являться непрерывной характеристикой. Д. Авнис с соавторами, рассматривая симметрию и ее комплементарную особенность – хиральность как непрерывное свойство, предложили использовать в качестве оценки степени хиральности молекулярной структуры (или ее фрагментов) так называемое расстояние симметрии (SD) – минимальное расстояние, необходимое для перемещения точек исходной (хиральной) формы для получения идеально симметричной формы ($SD = 0$) [19,20]: чем больше это значение, тем молекула более «хиральна» (верхний предел равен 100). Главное преимущество этого метода – возможность количественно сравнивать расстояние симметрии одного 3D-объекта относительно других элементов симметрии и находить локальные симметричные фрагменты. Позднее, теми же исследователями было предложено расширить возможности структурного анализа белков с помощью двумерной карты Рамачандрана путем создания трехмерной карты, включив статистический анализ количественной меры непрерывной хиральности аминокислотных остатков в каждой точке [21].

В работе [22] в качестве количественной оценки хиральности предлагается использовать отличие молекулы от ее образа, полученного в результате поворотов или зеркальных поворотов, т.е. количественная оценка хиральности связана с оценкой асимметрии молекулярной системы. В работе [23] проведен критический анализ метода функции диссимметрии молекул и ему подобных подходов, а также реализован усовершенствованный метод функции асимметрии, позволяющий более корректно и точно оценивать параметры асимметрии молекулы.

Основы физической теории хиральности при использовании одноэлектронных распределений плотности, прямо или косвенно определяемых молекулярными волновыми функциями, были развиты в работах П. Мези [24]. Другая попытка систематического построения теории хиральности на квантовохимическом уровне была предпринята А.В. Лузановым с соавт. [25]. Основная идея этой теории состоит в определении геометрических свойств пространственных кривых, связанных с траекториями электронов в молекулах. В качестве средней меры хиральности предлагается использовать индексы диссимметрии на основе оптической вращательной поляризуемости хиральных молекул.

Одним из более простых и универсальных, с нашей точки зрения, является подход к количественной оценке степени хиральности в иерархических структурах макромолекулярных систем, разработанный на кафедре биофизики МГУ [26]. Суть его состоит в построении последовательных векторов между соседними углеродами в цепи и определении их векторного произведения. Для определения знака хиральности спиральной вторичной структуры достаточным условием анализа является только взаимное расположение α -углеродов ($C\alpha$). Для оценки этого знака предложено использовать знак косинуса угла между вектором направления (суммой векторов между соседними атомами $C\alpha$) и вектором произведения (суммой всех векторных произведений).

Вышеизложенный метод был нами усовершенствован по следующим причинам. Во-первых, в качестве меры хиральности бралась длина вектора произведений, что не всегда приводило к правильной оценке хиральности (например, для двух последовательных правых спиралей, соединенных разными способами, в этом случае получаются кардинально разные результаты). Во-вторых, для оценки знака хиральности использовался знак косинуса угла между вектором направления и вектором произведения, что в определенных случаях могло привести к неверному определению знака хиральности.

Метод количественной оценки хиральности спиральных структур белков.

В качестве экспериментальных объектов были использованы спиральные структуры белков, представленные в международной базе данных PDB [27]. Рассмотрено 983 структуры белков – представителей 12 классов: оксидоредуктазы – 189, трансферазы – 86, гидролазы – 182, лиазы – 131, изомеразы – 113, лигазы – 89, транслоказы – 130, шапероны – 15, вирусные белки – 26, структурные белки – 13, белки эндо- и экзоцитоза – 7, белки транспорта электронов – 4.

Сущность предлагаемого метода рассмотрим на модели полипептидной цепи, состоящей из n аминокислотных остатков и имеющей, соответственно, n атомов $C\alpha$ в качестве опорных точек [28, 29]. Между каждыми двумя соседними опорными точками строим вектор v_i и для n опорных точек получаем $(n-1)$ векторов (рис. 1а). Для каждых трёх последовательных векторов рассчитываем их смешанное произведение (с учётом их координат):

$$([v_1, v_2], v_3) = (y_1 z_2 - y_2 z_1) x_3 + (z_1 x_2 - z_2 x_1) y_3 + (x_1 y_2 - x_2 y_1) z_3, \quad (1)$$

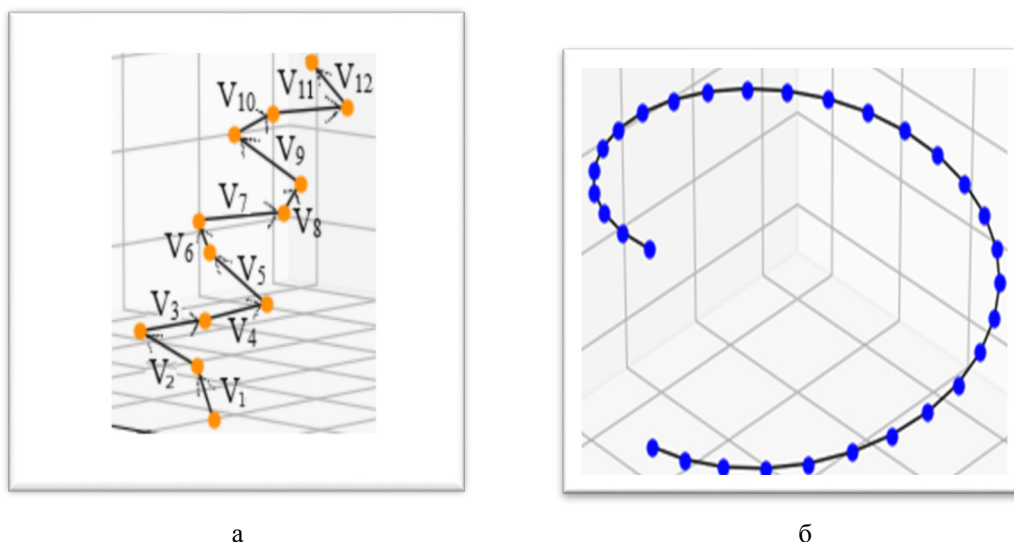


Рисунок 1. Модельная структура спирали белка: а – опорные точки и векторы; б – изображение цилиндрической винтовой линии с различным числом равномерно расположенных опорных точек

Сумма всех смешанных произведений может быть представлена в качестве характеристики хиральности спиральной структуры, и уравнение для её оценки можно записать следующим образом:

$$\chi = \sum_{i=1}^{n-3} ([v_i, v_{i+1}], v_{i+2}), \quad (2)$$

Исследована возможность нормировки хиральности спиральных белковых структур с соблюдением следующего принципа: поскольку хиральностью обладает физический объект, ее значение должно стремиться к некоторой постоянной величине при увеличении числа опорных точек, расположенных на том же объекте (то есть при увеличении плотности точек). Поэтому каждое смешанное произведение нормировалось на определенную степень k средней длины используемых в нем векторов. Подбор степени k осуществлялся исходя из следующего: поскольку основными объектами исследования являются белковые структуры с четко определенным расположением атомов углерода, в качестве эталона была взята цилиндрическая винтовая линия с равномерно расположенными точками (рис. 1б). Геометрическое исследование показало, что для сохранения конечной ненулевой хиральности при неограниченном увеличении числа точек следует взять пятую степень. Таким образом, нормировочный множитель рассчитывается по следующей формуле:

$$C_i = \left(\frac{1}{3} \sum_{j=0}^2 |v_{i+j}| \right)^5, \quad (3)$$

С учетом нормировки значение хиральности рассчитывается по следующей формуле:

$$\chi_{norm} = \sum_{i=1}^{n-3} \frac{([v_i, v_{i+1}], v_{i+2})}{C_i}, \quad (4)$$

С использованием разработанного метода получена карта нормированной хиральности для изученных белков. Карта представляют собой двумерный график, по горизонтальной оси которого отложена длина вторичной структуры в аминокислотных остатках (n), а по вертикальной оси – нормированная характеристика хиральности χ_{norm} (рис. 2). На картах правые α -спирали и 3_{10} -спирали располагаются в области $\chi_{norm} > 0$, а левые – $\chi_{norm} < 0$. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что, во-первых, α -спирали и 3_{10} -спирали представлены, в основном, правыми структурами, что соответствует теории знакопеременных хиральных структур и адекватно отражает данные, ранее представленные в научной литературе [3-6]. И, во-вторых, полученная характеристика хиральности линейно зависит от числа атомов в спирали.

В таблице 1 представлены данные диапазонов значений нормированной хиральности для представителей разных классов белков. Согласно проведенному исследованию, из общего количества идентифицированных α -спиралей примерно 99,4 % составляют α_R -спирали (правые α -спирали), а из общего количества 3_{10} -спиралей примерно 95,4 % составляют $(3_{10})_R$ -спирали (правые 3_{10} -спирали).

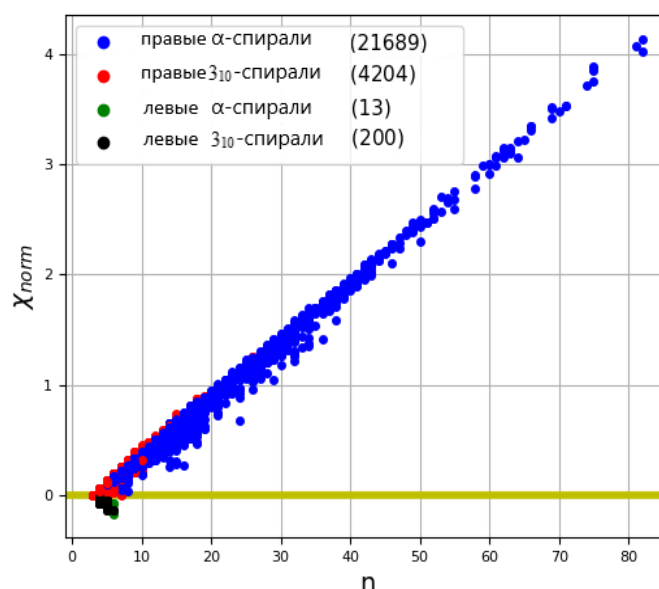


Рисунок 2. Карта нормированной хиральности изученных белков. В качестве экспериментальных объектов были использованы спиральные структуры белков, представленные в международной базе данных PDB

Что касается левых структур, то среди всех изученных классов белков левые спирали были идентифицированы почти во всех классах ферментов (табл. 2). Левые α -спирали составили 0.06 % от общего количества α -спиралей, а левые 3_{10} -спирали – 4.6 % от общего количества 3_{10} -спиралей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный метод оценки хиральности спиральных структур белков отличается небольшим количеством необходимой для его использования информации, а также простотой вычислений. Проведен анализ

Таблица 1. Диапазон значений нормированной хиральности для изученных классов белков

Класс фермента	α -Спирали				3_{10} -Спирали			
	α_R		α_L		$(3_{10})_R$		$(3_{10})_L$	
	общее кол-во	X_{norm}	общее кол-во	X_{norm}	общее кол-во	X_{norm}	общее кол-во	X_{norm}
Оксидоредуктазы	4180	0,024-3,005	6	(-0,054)-(-0,046)	735	0,008-1,725	13	(-0,115)-(-0,005)
Трансферазы	1669	0,015-1,559	-	-	191	0,025-0,881	6	(-0,122)-(-0,010)
Гидролазы	2949	0,026-3,528	3	(-0,047)-(-0,008)	373	0,034-0,773	43	(-0,132)-(-0,003)
Лиазы	1972	0,018-1,870	-	-	482	0,038-1,454	-	-
Изомеразы	2114	0,030-2,991	2	(-0,162), (-0,161)	348	0,004-1,263	1	(-0,001)
Лигазы	2965	0,007-1,425	-	-	659	0,002-1,420	15	(-0,015)-(-0,002)
Транслоказы	4525	0,009-4,019	-	-	1213	0,012-1,258	121	(-0,128)-(-0,005)
Шапероны	288	0,122-2,708	-	-	47	0,042-0,324	-	-
Вирусные белки	359	0,043-4,137	-	-	69	0,038-1,227	-	-
Структурные белки	172	0,097-3,532	-	-	17	0,044-0,180	2	(-0,118), (-0,035)
Белки эндо- и экзоцитоза	497	0,135-3,480	2	(-0,067), (-0,066)	34	0,043-0,479	-	-
Белки транспорта электронов	31	0,468-1,550	-	-	3	0,1-0,122	-	-

Таблица 2. Количество левых спиралей в изученных структурах белков

Класс белка	Общее кол-во спиралей (α -спиралей /спиралей 3_{10})	Кол-во левых спиралей (α -спиралей/ спиралей 3_{10})	% левых спиралей	
			α_L	$(3_{10})_L$
Оксидоредуктазы	4186/748	6/13	0,14	1,74
Трансферазы	1669/197	-/6	-	3,04
Гидролазы	2952/416	3/43	0,10	10,34
Лиазы	1972/482	-/-	-	-
Изомеразы	2116/349	2/1	0,09	0,29
Лигазы	2965/674	-/15	-	2,23
Транслоказы	4525/1334	-/121	-	9,07
Шапероны	288/47	-/-	-	-
Вирусные белки	359/69	-/-	-	-
Структурные белки	172/19	-/2	-	10,53
Белки эндо- и экзоцитоза	499/34	2/-	0,4	-
Белки транспорта электронов	31/3	-/-	-	-

хиральности структур α - и 3_{10} -спиралей для 983 белков. Полученные результаты соответствуют теории знакопеременных хиральных структур в иерархии белков. Построены карты хиральности вторичных спиральных структур для всех классов белков. Проведенный анализ вторичных белковых структур с использованием разработанного метода показал, что для всех изученных белков α -спирали и 3_{10} -спирали представлены, в основном, правыми структурами. Левые α -спирали составили 0,06 % от общего количества α -спиралей, а левые 3_{10} -спирали – 4,6 % от общего количества 3_{10} -спиралей. Скорее всего, образование левых 3_{10} -спиралей стерически более выгодно, чем образование более длинных левых α -спиралей. Примечательно, что наибольшее процентное содержание $(3_{10})_L$ -спиралей было обнаружено в гидролазах, транслоказах и структурных белках. Наибольший процент α_L -спиралей был идентифицирован в структурах белков эндо- и экзоцитоза. При этом в структурах лиаз, вирусных белков, шаперонов и белков транспорта электронов левых спиралей обнаружено не было. Данный метод можно рассматривать как шаг к раскрытию общих принципов и механизмов фолдинга белков.

Список литературы / References:

1. Cintas P. Chirality of living systems: a helping hand from crystals and oligopeptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2002, vol. 41, pp. 1139-1145.
2. Barron L.D. From Cosmic Chirality to Protein Structure: Lord Kelvin's Legacy. *Chirality*, 2012. doi: 10.1002/chir.22017
3. Tverdislov V.A., Malyshko E.V. On regularities in the spontaneous formation of structural hierarchies in chiral systems of nonliving and living matter. *Physics Uspekhi*, 2019, vol. 62, no. 4, pp. 354-363.
4. Tverdislov V.A. Chirality as a primary switch of hierarchical levels in molecular biological systems. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 1, pp. 159-164.
5. Crick F.H.C. The packing of α -helices: simple coiled-coils. *Acta Cryst.*, 1953, vol. 6, pp. 689-692.
6. Barlow D.J., Thornton J.M. Helix geometry in proteins. *J. Mol. Biol.*, 1988, vol. 201, pp. 601-619.
7. Efimov A.V. Chirality and Handedness of Protein Structures. *Biochemistry*, 2018, vol. 83, no 1, pp. 103-110.
8. Novotny Kleywegt G.J. A Survey of left-handed helices in protein structures. *Mol. Biol.*, 2005, vol. 347, no. 2, pp. 231-241.
9. Cao Ch., Wang G., Liu A., Xu Sh., Wang L., Zou Sh. A new secondary structure assignment algorithm using C_α backbone fragments. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, vol. 17, pp. 333-349.
10. Ramachandran G.N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.*, 1963, vol. 7, no. 1, pp. 95-99.
11. Harris A.B., Kamien R.D., Lubensky T.C. Molecular chirality and chiral parameters. *Rev. Mod. Phys.*, 1999, vol. 71, pp. 1745-1757.
12. Guye P.A. Influence de la constitution chimique des derives du carbone sur le sens et les variations de leur pouvoir rotatoire. *Compt. Rendus*, 1890, vol. 110, p. 714.
13. Ruch E., Schönhofer A. Näherungsformeln für spiegelungsantimetrische Moleküleigenschaften. *Theor. Chim. acta*, 1968, vol. 10, no. 2, pp. 91-110.
14. Randic M., Razinger M. Molecular shapes and chirality. *J. Chem. Inform. Comp. Sci.*, 1996, vol. 36, no. 3, pp. 429-441.
15. Peng X-L., Fang K-T, Hu Q-N, Liang Yi-Z. Impersonality of the connectivity index and recomposition of topological indices according to different properties. *Molecules*, 2004, vol. 9, no. 12, pp. 1089-1099.
16. Zhao T., Zhang O., Long H., Xu L. Graph theoretical representation of atomic asymmetry and molecular chirality of benzenoids in two-dimensional space. *PLOS ONE*, 2014, vol. 9, no. 7, p. e102043.

17. Buda A.B., Mislow K.A. A Hausdorff chirality measure. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1992, vol. 114, no. 15, pp. 6006-6012.
18. Petitjean M. Chiral mixtures. *J. Math. Physics*, 2002, vol. 43, no. 8, pp. 4147-4157.
19. Avnir D., Meyer A.V. Quantifying the degree of molecular shape. A chirality measure. *J. Molec. Struct. (Theochem.)*, 1991, vol. 226, pp. 211-222.
20. Zabrodsky H., Avnir D. Continuous Symmetry Measures, IV: Chirality. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, pp. 462-473.
21. Wang H., Avnir D., Tuvi-Arad I. Chiral Ramachandran plots II: general trends and protein chirality spectra. *Biochemistry*, 2018, vol. 57, no. 45, pp. 6395-6403.
22. Зоркий П.М., Афонина Н.Н. *Симметрия молекул и кристаллов*. М.: Изд-во Моск. Унта, 1979, 176 с. [Zorky P.M., Afonina N.N. *Symmetry of molecules and crystals*. Moscow: Unta, 1979, 176 p. (In Russ.)]
23. Alikhanidi S.E., Kuz'min V.E. Quantitative Evaluation of Molecular Chirality on Base of an Optimized Approach to Original and Reflected Structures Comparison. *Reports of NAS of Ukraine*, 1999, vol. 3, pp. 138-141.
24. Mezey P.G. Generalized chirality and symmetry deficiency. *J. Math. Chem.*, 1998, vol. 23, pp. 65-84.
25. Luzanov A.V. Positive chirality measures from chiroptical pseudoscalars: applications to carbon-containing molecular systems. *Functional materials*, 2015, vol. 22, no. 3, pp. 355-364.
26. Sidorova A.E., Malyshko E.V., Kotov A.R., Tverdislov V.A., Ustinin M.N. Quantitative criteria of chirality in hierarchical protein structures. *Biophysics*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 155-166.
27. The Protein Data Bank. URL: <http://www.rcsb.org/>
28. Сидорова А.Э., Луценко А.О., Шпигун Д.К., Малышко Е.В., Твердислов В.А. Методы определения знака хиральности спиральных и суперспиральных структур белков. *Биофизика*, 2021, т. 66, № 3, с. 421-428. [Sidorova A.E., Lutsenko A.O., Shpigun D.K., Malyshko E.V., Tverdislov V.A. Methods to determine the chirality sign for helical and superhelical protein structures. *Biophysics*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 421-428. (In Russ.)]
29. Sidorova A.E., Malyshko E.V., Lutsenko A.O., Shpigun D.K., Bagrova O.E. Protein helical structures: defining handedness and localization features. *Symmetry*, 2021, vol. 13, no 5, p. 879.

METHOD FOR DETERMINING THE CHIRALITY OF PROTEIN HELICAL STRUCTURES

Shpigun D.K., Lutsenko A.O., Sidorova A.E.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory St., 1/2, Moscow, 119234, Russia; e-mail: denish.den@mail.ru, aleksluchrus@yandex.ru, sky314bone@mail.ru

Abstract. In the present study, various approaches to the quantitation of the molecular chirality, one of the pressing problems of biochemical physics, are considered. A new relatively simple method for estimating chirality in protein secondary structures is proposed. The method is based on defining the reference (control) points – alpha-carbon atoms in the polypeptide chain followed by calculating the mixed products of bond vectors associated with relative position of these points. Special attention was given to the normalization of chirality in protein helical structures. We analyzed 983 proteins of 12 classes taken from the PDB database. Along with energetically favorable right-handed α - and 3_{10} -helices, the secondary structure motifs in the left-handed conformation were found. Based on the developed method a chirality map of protein helical structures was obtained. This method can be considered as a step towards extending the concept of chirality to hierarchically higher categories of objects - protein globules and supramolecular structures.

Key words: proteins, chirality, alpha-carbon, α -helix, 3_{10} -helix, chirality map.