

КРИТЕРИЙ ФОРМЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ КРИВЫХ САМОАССОЦИИИ МОЛЕКУЛ В РАСТВОРЕ

Евстигнеев В.П., Евстигнеев М.П.

ФГАУ ВО «Севастопольский государственный университет»

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

e-mail: vald_e@rambler.ru

Аннотация. В работе введен интегральный критерий формы концентрационной зависимости экспериментального параметра молекул при их агрегации в водном растворе. Под критерием понимается расчетное значение кривизны кривой, осредненной по всем экспериментальным точкам для данного соединения. Предложенный критерий формы экспериментальных кривых позволил унифицировать и сжать размерность представления экспериментальных данных и провести сравнение кривых по разным веществам. На основании критерия может быть выработано дискриминационное правило для определения области допустимых значений равновесной константы K неизвестного вещества. Критерий кривизны может быть использован для выработки оптимальной стратегии эксперимента, направленной на достоверное определение параметров агрегации. В работе проведен теоретический анализ кривизны функции зависимости химического сдвига от концентрации вещества в растворе на основе некооперативной бесконечномерной модели самоассоциации. Валидация критерия проводилась по данным ^1H -ЯМР спектроскопии, включающим химические сдвиги 78-ми протонов 17-ти ароматических соединений.

Ключевые слова: самоассоциация, кривизна кривой, биологически активные соединения, оптимальное планирование эксперимента.

FORM CRITERION OF EXPERIMENTAL CURVES OF MOLECULAR SELF-ASSOCIATION IN SOLUTION

Evstigneev V.P., Evstigneev M.P.

Sevastopol State University

Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

e-mail: vald_e@rambler.ru

Abstract. Present work introduces integral form criterion of concentration dependence of molecule's experimental parameter induced in aqueous solution due to its self-aggregation. Empirical curvature of a curve averaged over all experimental points is suggested to be such a criterion. The form criterion enables unifying and reducing dimensions of data representation and comparing of data curves of different compounds. On the basis of the criterion a discrimination rule for determination of equilibrium constant K tolerance range can be constructed. Curvature value can be useful in order to draw up a strategy for optimal design of molecular self-aggregation experiment aimed to obtain reliable parameters' estimates. Theoretical analysis of curvature function of chemical shift dependence on molecules concentration was done using indefinite non-cooperative model of self-aggregation in aqueous solution. Validation of the criterion was implemented using ^1H -NMR spectroscopy data on chemical shifts of 78 protons of 17 aromatic compounds.

Key words: self-association, curvature, biologically active compounds, optimal experimental design.

Введение.

Известно [1], что оценки параметров агрегации малых биологически активных соединений в водном растворе по данным экспериментального исследования некоторой степени чувствительны к концентрационным диапазонам исследуемых веществ. Так для спектрофотометрии характерны микромолярные диапазоны концентраций, в то время как для ЯМР-спектроскопии необходимая степень чувствительности может быть достигнута при миллимолярных диапазонах исследуемых веществ в растворе. При этом анализ динамического равновесия в растворе может осуществляться при помощи моделей с различной степенью допущений, например, агрегация с образованием только 1:1 комплексов или бесконечномерная ассоциация [1, 2] с учетом или без учета кооперативности взаимодействия молекул в агрегатах.

Вопросы, связанные с выбором оптимальной модели агрегации, оценка надежности и интерпретация получаемых параметров комплексообразования не получили должной систематической проработки и на практике, как правило, отдаются на откуп исследователю. В свете этого одной из важнейших практических задач является выработка оптимальной стратегии эксперимента, на решение которой направлены усилия настоящей работы. Целью исследования была выработка единого количественного критерия формы экспериментальных кривых, позволяющего унифицировать и сжать размерность представления экспериментальных данных, осуществлять «мониторинг» качества проведения эксперимента.

Характеристика экспериментальных данных.

В качестве исходных данных использовалась база концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов малых биологически активных ароматических соединений в водном растворе, полученных методом ^1H -ЯМР спектроскопии. Всего в работе использованы экспериментальные данные по 78-ми протонам 17-ти ароматических соединений (EB, PF, AO, NOV, NOR, DOX, DAU, CAF, ActII, ActIII, ActIV, ActV, NMD, FMN, PI, AMD, NOG).

Для каждого протона концентрационная зависимость химического сдвига может быть описана некооперативной моделью бесконечномерной самоассоциации. В однокомпонентном растворе, содержащем

вещество X , совокупный экспериментальный параметр молекул, образующих сколь угодно длинные комплексы, может быть описан выражением:

$$\delta = \delta_m + 2(\delta_d - \delta_m) \frac{2Kx_0 + 1 - \sqrt{4Kx_0 + 1}}{2Kx_0}, \quad (1)$$

где δ_m , δ_d – внутренний параметр молекулы X в мономерной форме и самоассоциате; K – равновесная константа самоассоциации; x – мономерная концентрация вещества X в растворе, которая определяется из исходной концентрации вещества x_0 и выражения для закона сохранения массы:

$$x = \frac{2Kx_0 + 1 - \sqrt{4Kx_0 + 1}}{2K^2x_0}. \quad (2)$$

Уравнения (1) и (2) удобно [2] выразить через безразмерные исходные и мономерные концентрации $d_0 = Kx_0$ и $d = Kx$:

$$\delta = \delta_m + 2(\delta_d - \delta_m) \frac{2d_0 + 1 - \sqrt{4d_0 + 1}}{2d_0},$$

$$d = \frac{2d_0 + 1 - \sqrt{4d_0 + 1}}{2d_0},$$

где область определения d заключена в интервале $[0;1)$.

На рисунок 1 представлена вся совокупность концентрационных кривых, приведенных к нулевому химическому сдвигу ($\delta - \delta_m$). Все кривые отражают монотонный спад химического сдвига протонов при увеличении концентрации вещества X в растворе. Тем не менее, от протона к протону экспериментальные кривые отличаются выбранным исследователем диапазоном концентраций, концентрационным шагом, шириной диапазона значений химического сдвига. Это не позволяет унифицировать набор множественных экспериментальных данных для получения полезных для практики следствий, даже, несмотря на схожесть форм кривых. Для решения подобной задачи нам кажется разумным использовать количественный критерий изогнутости кривых.

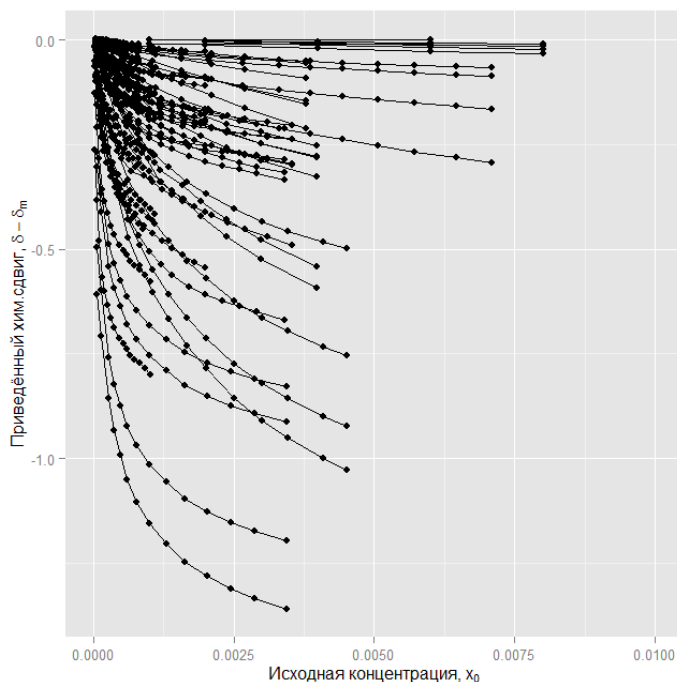


Рисунок 1 – График приведенных концентрационных зависимостей ($\delta - \delta_m$) по данным химических сдвигов 78 протонов

Кривизна концентрационной кривой.

Мерой изогнутости кривой, заданной аналитической дважды дифференцируемой функцией $y=f(x)$, является кривизна кривой, рассчитываемая для любой точки кривой по формуле:

$$K = \frac{|y''|}{(1 + y'^2)^{3/2}}.$$

В случае концентрационной зависимости химического сдвига протонов величина кривизны кривой $\delta = \delta(d_0)$ (1) может быть найдена точно по формуле:

$$K_\delta = 4K^2 |\delta_d - \delta_m| \frac{(1-d)^5 (2+d)}{\left[(1+d)^2 + 4K^2 (\delta_d - \delta_m)^2 (1-d)^6 \right]^{3/2}} \quad (3)$$

На рисунок 2 представлен график функции (3) с одним выраженным максимумом, располагающимся в области очень больших концентраций вещества. Для рассмотренных соединений экспериментальные диапазоны концентраций не превышали величины, соответствующей $d=0.03$, поэтому первым слагаемым выражения под знаком степени $3/2$ в знаменателе дроби можно пренебречь и упростить запись (3):

$$K_\delta = \frac{1}{2K(\delta_d - \delta_m)^2} \cdot \frac{2+d}{(1-d)^4} \quad (4)$$

Кроме того, при очень низких концентрационных диапазонах ($d \rightarrow 0$) кривизна оказывается практически постоянной ($K_\delta = K^{-1} \cdot (\delta_d - \delta_m)^{-2}$) и теоретически может служить независимой оценкой параметров модели динамического равновесия в растворе, однако при большей точности эксперимента.

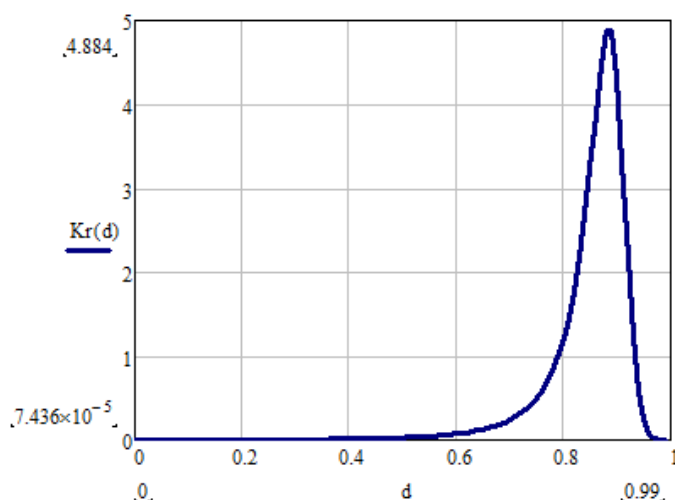


Рисунок 2 – График кривизны концентрационной кривой, описываемой уравнением (1) при $K=700 \text{ M}^{-1}$ и $|\delta_d - \delta_m|=1 \text{ ppm}$

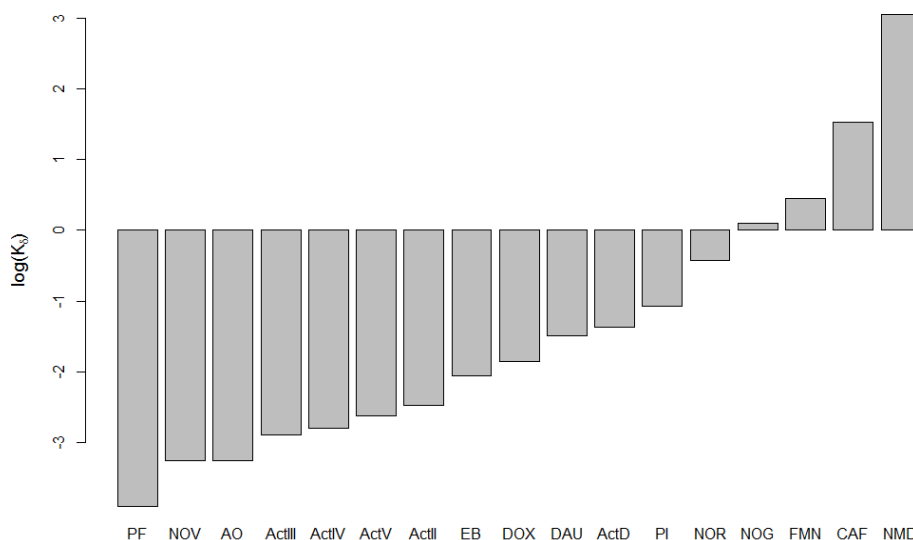


Рисунок 3 – Распределение ароматических биологически активных соединений по средней кривизне их концентрационных зависимостей

На практике при дискретных измерениях мерой изогнутости кривой может служить средняя кривизна, которая определяется отношением угла смежности между двумя точками кривой к расстоянию между ними. Очевидно, что в разных участках кривой средняя кривизна различна (см. рис. 2). По этим причинам использование отдельных значений эмпирической кривизны некорректно. Взамен них требуется совокупная

характеристика каждой кривой, например, среднее арифметическое всех значений $\langle K_\delta \rangle$. Однако, вследствие случайных флуктуаций экспериментальных точек рассеяние величин кривизны оказывается существенным, включая грубые выбросы. В этом случае предпочтительнее использовать робастную оценку центра всех значений – медиану.

Оценка критерия $\langle K_\delta \rangle$ определяется динамикой агрегации молекул в растворе, а также случайными флуктуациям в ограниченной экспериментальной выборке, влияние которых в оптимальных условиях должно минимизироваться. На рис.3 видно, что средняя кривизна для молекул NOG, FMN, CAF, NMD существенно отличается от остальной группы веществ. Равновесные константы взаимодействия для 3-х из этих веществ являются низкими. Однако попадание в эту группу NOG, вероятно, связано с неудовлетворительной стратегией эксперимента, т.е. с недостаточной освещенностью диапазона возможных значений δ .

Выводы.

В работе предложен интегральный количественный критерий формы экспериментальных кривых, позволяющий унифицировать и сжать размерность представления экспериментальных данных. Этот критерий можно использовать для сравнения экспериментальных кривых разных протонов одного соединения или разных веществ. На основании критерия $\langle K_\delta \rangle$ может быть выработано дискриминационное правило для определения области допустимых значений равновесной константы K нового вещества. Вследствие чувствительности критерия к случайным флуктуациям экспериментальных данных, критерий может быть потенциально использован для выработки оптимальной стратегии эксперимента, направленной на достоверное определение параметров агрегации.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект №15-33-20284).

Список литературы / References:

1. Evstigneev M.P. Hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution. *Int. Rev. Phys. Chem.*, 2014, vol. 33:2, pp. 229-273.
2. Markvoort A.J., ten Eikelder H.M.M., Hilbers P.A.J., de Greef T.F.A. Fragmentation and coagulation in supramolecular (co)polymerization kinetics. *ACS Cent. Sci.*, 2016, DOI: 10.1021/acscentsci.6b00009.

IN SILICO ПОИСК ДИМЕРНЫХ СОСТОЯНИЙ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНА

Замалетдинов М.Ф.¹, Кузнецов А.С.¹, Ефремов Р.Г.^{1,2}

¹ ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, ГСП-7, 117997, РФ

²Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики
ул. Мясницкая, 20, г. Москва, 101000, РФ
e-mail: miftakhz@gmail.com

Аннотация. Белки семейства рецептора инсулина относятся к классу рецепторных тирозинкиназ, который включает в себя три рецептора: рецептор инсулина (IR), рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R) и рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR). Они являются важными объектами исследования, так как нарушения в их работе могут приводить к патологическим состояниям и отклонениям в развитии.

Изучение работы данных рецепторов затруднено из-за необходимости учета влияния мембранного окружения на их правильную организацию и функционирование. В настоящий момент не существует единой теории о механизме активации тирозинкиназ этого семейства, но было показано, что важную роль играет процесс димеризации трансмембранного (ТМ) домена. В данной работе построили модели димеров ТМ-доменов рецепторов IR, IGF-1R, IRR и изучили их структурные характеристики методами компьютерного моделирования. Полученные модели могут быть использованы в будущем для исследования влияния мембранного окружения и точечных мутаций на димеризацию и, следовательно, на активность рецепторов.

Ключевые слова: рецептор инсулина, трансмембранный домен, молекулярная динамика, взаимодействие альфа-спиралей.