

**ИЗМЕНЕНИЕ ИНДЕКСА ХИРАЛЬНОСТИ ПРИ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ
МИНИ-БЕЛКОВ TRP-CAGE**

Хамицаев А.К., Яковенко Л.В.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

*ул. Ленинские горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ**e-mail: a.khamitsaev@yandex.ru*

Аннотация. Недавно открытая закономерность чередования знака хиральности в иерархиях уровней структурной организации белков и нуклеиновых кислот основана на глубокой взаимосвязи между свойствами симметрии макромолекул и их физико-химическими свойствами. Хиральность молекулярных структур обычно описывается в терминах бинарной логики: структуры либо хиральны, либо ахиральны. Для выявления физических механизмов, определяющих роль гомохиральности первичных структур белков и нуклеиновых кислот в процессах фолдинга и конформационных перестроек, необходимо использовать подходящую непрерывную меру хиральности и определить взаимосвязь между ее изменениями и изменениями физических характеристик макромолекул в этих процессах. В настоящей работе в качестве непрерывной меры хиральности использован индекс хиральности, предложенный А.В. Лузановым, рассчитаны его изменения при фолдинге ряда мини-белков типа Trp-cage и полученные данные сопоставлены с соответствующими изменениями энтропии. Особенностью индекса хиральности является смена знака при изменении знака хиральности. В связи с этим степень симметрии молекулы связана с модулем индекса хиральности: чем меньше его модуль, тем симметричнее молекула. Рассчитанные значения энтропии мини-белков коррелируют с модулями их индексов хиральности.

Ключевые слова: хиральность, индекс хиральности, энтропия, конформационные изменения, мини-белки.

**CHANGES OF THE CHIRALITY INDEX DURING CONFORMATIONAL TRANSFORMATIONS
OF MINI-PROTEINS TRP-CAGE**

Khamizayev A.K., Yakovenko L.V.

M.V.Lomonosov Moscow State University

*Leninskie Gory, 1, bld. 2, Moscow, 119991, Russia**e-mail: a.khamitsaev@yandex.ru*

Abstract. Recently discovered regularity in alternation of the chirality sense in the hierarchies of structural organisation levels of proteins and nucleic acids is based on a deep interconnection of macromolecule symmetry with its physical-chemical properties. Chirality of molecular structures is usually described in terms of binary logic, i.e. the structures are either chiral, or achiral. To reveal physical mechanisms determining the role of homochirality of primary structures of proteins and nucleic acids in processes of folding and conformational rearrangements it is necessary to use a suitable continuous measure of chirality and find the relationship between its changes and changes of the physical characteristics of macromolecules in such processes. In this work the chirality index suggested by A.V. Luzanov is used as a continuous measure of chirality, its changes during foldings of a number of mini-proteins of the Trp-cage class are calculated and compared with the corresponding changes in entropy. The distinctive quality of the chirality index consists in its changing sign with the change of the chirality sense. Due to this property the degree of molecular symmetry is related to the modulus of the chirality index: the lower the modulus, the more symmetric is the molecule. The calculated values of entropies of mini-proteins correlate with their chirality index moduli.

Key words: chirality, chirality index, entropy, conformational transformations, mini-proteins.

Введение. Физические и химические свойства веществ во многом определяются симметрией молекул или ее нарушениями. Одним из нарушений симметрии молекул является их хиральность, проявляющаяся в оптической активности веществ. Хиральность связана с отсутствием у молекулы зеркально-поворотной оси симметрии, поэтому такая молекула отличается от своего зеркального отражения так же, как правая рука отличается от левой или правый винт от левого. В стереохимии приняты определенные правила, согласно которым в молекулах могут быть выделены хиральные группы атомов и им может быть приписана «правая» (обозначаемая символами D или R) или «левая» (L или S) хиральность. Направление вращения плоскости поляризации света не всегда совпадает с типом хиральности, тем не менее часто говорят о «знаке» хиральности, подразумевая принадлежность молекулы к определенному типу хиральных структур. Многие биологические молекулы хиральны, т.е. имеют один или несколько хиральных центров – атомов углерода, связанных с четырьмя разными атомами или группами атомов. Пара молекул, различающихся только типом хиральности, называется парой энантиомеров.

Все биомacroмолекулы построены из блоков одной хиральности (т.е. гомохиральных), что является фундаментальной особенностью живых систем, получившей название хиральной чистоты биосферы [1, 2]. Недавно была открыта новая закономерность в молекулярной биологии – чередование «знака» хиральности в иерархиях структурных уровней белков и нуклеиновых кислот [3]. Эта системная закономерность позволяет по-новому подойти к решению важнейшей проблемы теоретической биофизики – выяснению физических основ взаимосвязи структуры и функций биомacroмолекул. Одной из главных задач при этом является разработка методов сравнения макромолекул по степени хиральности. Традиционно хиральность молекулы оценивалась по наличию хиральных центров: молекула либо хиральна, либо нет, но в последние два десятилетия ведутся активные поиски непрерывной количественной меры хиральности, которая позволила бы определять степень хиральности [4-6].

Основная часть работ в этой области посвящена конструированию геометрических мер хиральности, среди которых можно выделить меры, основанные на измерении степени принадлежности структуры к определенной группе симметрии [4], и меры, использующие пространственные преобразования для определения степени различия энантиомеров [Статья с аминокислотой Аминокислоты]. Существуют также меры, учитывающие физические особенности системы, и в большинстве случаев основанные на электронных свойствах молекул [5-7]. К ним относится и индекс хиральности, предложенный А.В. Лузановым [7], косвенно связанный с оптической активностью молекулы.

Так как хиральность связана с нарушением симметрии, очевидно, что со степенью хиральности должна быть связана энтропия системы. Хиральность определяется топологическими (геометрическими) характеристиками молекулы, а энтропия во многом определяет возможность возникновения иерархических макромолекулярных структур. Гомохиральность первичных структур белков и нуклеиновых кислот ограничивает множество доступных макромолекулам конформаций, что, возможно, обуславливает их правильный фолдинг. При наличии корреляции между мерой хиральности и энтропией в некоторых задачах, связанных с прогнозом функциональных особенностей макромолекул, вместо энтропии и свободной энергии можно использовать меру хиральности. При молекулярном моделировании расчет энтропии и свободной энергии макромолекул требует значительных затрат временных и вычислительных ресурсов. Использование меры хиральности позволит быстро оценить возможность взаимодействия лиганда с макромолекулой исследуемого соединения.

Метод расчета хиральности макромолекул. При выборе меры хиральности, подходящей для сравнения асимметрии двух макромолекул, применялись следующие критерии отбора.

1. Мера должна быть инвариантна относительно системы атомных координат и вращения в пространстве.
2. Численные значения меры для двух зеркальных изображений должны иметь противоположный знак, но равную величину. Для ахиральных молекул значение меры должно быть равно нулю.
3. Мера должна зависеть от физических свойств атомов, входящих в молекулу, а не только от ее геометрии.
4. Мера должна быть аддитивной.

Указанным требованиям удовлетворяет индекс хиральности, предложенный в работе [7].

Основная идея метода заключается в применении теории спектральных моментов для построения псевдоскалярных величин, зависящих от электронной структуры молекулы и связанных с ее оптической активностью. Ненулевые псевдоскалярные величины используются для введения квантово-механического оператора хиральности, зависящего от электронных параметров системы. В качестве частотно-зависимой характеристики, допускающей спектральное представление, используется вращательная поляризуемость $\beta(\omega)$, описывающая оптическую активность молекулы на заданной частоте ω .

$$\beta(\omega) = \omega \sum_{m \neq 0} (\omega - \lambda_m)^{-1} l_{0m} r_{m0}.$$

Здесь l_{0n} и r_{0n} – матричные элементы, полученные действием операторов момента импульса и координаты электрона, вида

$$a_{0n} = \langle 0 | a | n \rangle,$$

описывающие переход системы из основного состояния в возбужденное; λ_n соответствует энергии возбуждения (используется атомная система единиц).

Псевдоскалярные величины получаются путем разложения по ω^{-1} с учетом условия не обращения в ноль полученных в результате разложения моментов в квазиклассическом пределе.

$$K^{[\alpha]} = -Tr \mathbf{l}^{(\alpha+1)} \cdot \mathbf{r}^{(\alpha)} = Tr \mathbf{l}^{(\alpha)} \cdot \mathbf{p}^{(\alpha)},$$

где \mathbf{l} , \mathbf{p} и \mathbf{r} – операторы момента импульса, импульса и координаты электрона соответственно, (α) – производная по времени порядка α .

Первый ненулевой псевдоскаляр получен для производной второго порядка:

$$K^{[2]} = Tr(\ddot{\mathbf{l}} \cdot \ddot{\mathbf{p}}) = Tr(\mathbf{p} \times \dot{\mathbf{p}}) \cdot \ddot{\mathbf{p}} = Tr \hat{\kappa},$$

где $\hat{\kappa}$ – оператор хиральности.

Значение индекса хиральности определяется средним значением оператора $\hat{\kappa}$.

$$\langle \kappa \rangle_{\psi} = Tr \hat{\kappa} \cdot D_1,$$

где D_1 – одноэлектронная матрица плотности, для вектора состояния ψ .

Выражение для оператора импульса можно получить, проведя аналогичные методу Хюккеля преобразования. Приведем лишь окончательные выражения, необходимые для расчета индекса хиральности.

$$p^x = -[h, x] = \|(X_{\mu} - X_{\nu}) B_{\mu\nu}\|,$$

$$\dot{p}^x = -[h, p^x],$$

$$\ddot{p}^x = -[h, \dot{p}^x].$$

Здесь h – оператор Гамильтона, p^x матрица импульса, а $B_{\mu\nu}$ матрица связей молекулы.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования были выбраны несколько мини-белков, образующих класс Trp-cage [8, 9]. Несмотря на малые размеры (первичные структуры состоят всего из 20–22 аминокислотных остатков), они способны к самосборке с образованием третичной структуры в виде компактной глобулы. Движущей силой самосборки считается гидрофобное ядро, образованное тирозином и двумя остатками пролина на каждой

стороне от индольного кольца триптофана. Небольшой размер, архитектурная простота и ограниченная конформационная гибкость делают эти мини-белки удобной модельной системой для вычислительного эксперимента.

Расчет энтропии мини-белка проводился в программном пакете Gromacs 2016 методом квазигармонической аппроксимации. Перед началом молекулярного моделирования для каждой структуры выполнялась минимизация энергии, ограниченная 1000 шагами с силой 100 кДж/моль*нм, затем выполнялся молекулярно-динамический расчет в течение 5 нс для третичной структуры белка и 1 нс для первичной структуры (шаг по времени 0,5 фс); температура системы поддерживалась на уровне 300 К; траектория была сохранена с шагом 5 пс для последующего анализа. Перед началом моделирования методом молекулярной динамики система была помещена в кубический бокс со стороной 7 нм без растворителя, для концевых участков полипептидной цепи были выбраны ионы COO^- и NH^+ , в качестве силового поля применено полноатомное поле OPLS-AA.

Структуры белков в формате pdb были взяты из открытой базы RCSB PDB, первичные структуры были построены по известной последовательности FASTA в программе PyMOL.

Результаты. Основной целью работы было выяснение возможности корреляции изменений энтропии и индекса хиральности в процессе фолдинга. Характеристики исследованных белков представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристики использованных мини-белков

Название белка	Количество аминокислотных остатков	Число атомов	FASTA
1L2Y	20	304	NLYIQWLKDGGPSSGRPPPS
2JOF	20	284	DAYAQWLKDGGPSSGRPPPS
2LDJ	20	314	NLYIQWLKDQGPSSGRPPPS
2LL5	22	286	GDAYAQWLADGGPSSGRPPPSG

Все рассматриваемые белки обладают схожими первичными структурами: $\text{XXYXXWXXXXGPXXXXPPX}$ [7]. Основным стабилизирующим фактором третичной структуры белков Trp-cage является взаимодействие аминокислотной группы глицина с карбонильной группой триптофана, а также NH-группы триптофана с COO^- группой аргинина. Благодаря гидрофобному ядру, состоящему из двух остатков пролина и триптофана, белок образует компактную глобулу [8].

Методом молекулярного моделирования были получены значения энтропии для известных ЯМР структур белков из базы данных. Как и следовало ожидать, значение энтропии оказалось максимальным для белка с наибольшим количеством атомов. Затем были проведены расчеты энтропии прямолинейных полипептидных цепей (первичных структур), сконструированных на основе последовательностей FASTA.

Для удобства сравнения результаты молекулярного моделирования и расчета индекса хиральности представлены в таблице 2. Значение индекса хиральности $K1$ соответствует прямой цепи до начала процесса фолдинга, а $K3$ – третичной структуре белка.

Таблица 2 – Сравнение рассчитанных значений энтропии и индекса хиральности

Белок	Энтропия третичной структуры, Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹	Энтропия первичной структуры, Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹	$K3$	$K1$
1L2Y	2271	3067	-136	225
2JOF	2128	2982	-54	218
2LDJ	2381	3146	104	233
2LL5	2036	2839	41	189

Можно заметить наличие прямой зависимости между энтропией первичной и третичной структур. В процессе фолдинга энтропия полипептида уменьшается, при этом соотношение значений энтропии для разных полипептидов при переходе от первичной к третичной структуре сохраняется. Для прямых полипептидных цепей, состоящих из L-аминокислот, индексы хиральности строго положительны, а для третичных структур принимает как положительные, так и отрицательные значения. Такое поведение индекса хиральности связано, скорее всего, с расположением аминокислот в глобулярной структуре, поскольку в ней, в отличие от прямой полипептидной цепи, помимо асимметрии самих аминокислот важную роль играет их взаимная ориентация.

Зависимость между индексом хиральности и энтропией системы имеет выраженный нелинейный характер (см. рис. 1), в связи с чем для аппроксимации результатов некоторой функцией необходимо провести достаточно большое количество вычислительных экспериментов. В то же время, графики зависимости энтропии от модуля индекса хиральности (см. рис. 2) имеют более простой вид: чем выше энтропия системы, тем выше значение модуля индекса хиральности (за исключением последней точки на рисунке 2а).

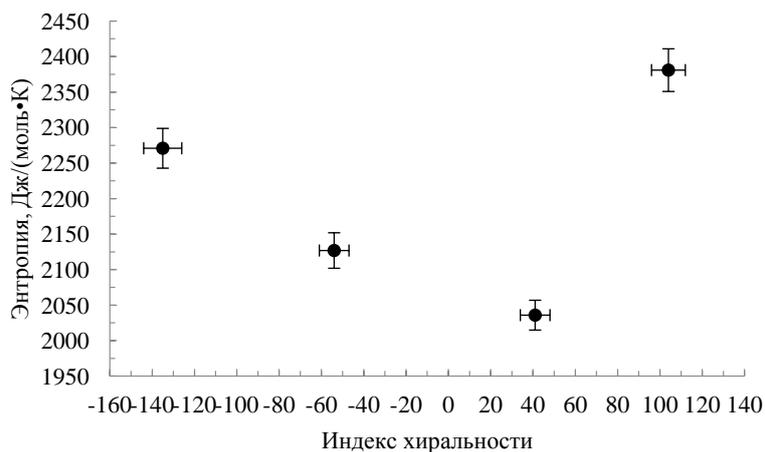


Рисунок 1 – Зависимость энтропии от индекса хиральности глобулярной структуры; для расчета погрешности было выполнено 7 вычислительных экспериментов для каждой структуры

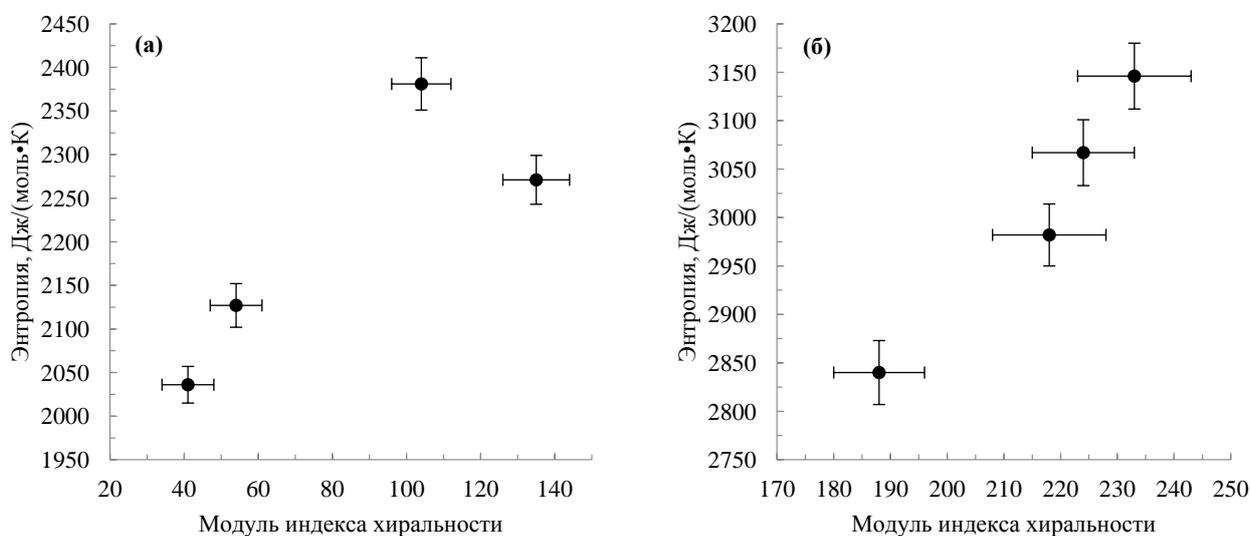


Рисунок 2 – Зависимость энтропии от модуля индекса хиральности: (а) – для глобулярной структуры, (б) – для прямой полипептидной цепи; для расчета погрешности было выполнено 7 вычислительных экспериментов для каждой структуры

Такая зависимость может быть объяснена на основе естественной связи между энтропией и симметрией системы [10]: чем более симметрична молекула, тем меньшее значение энтропии имеет ее «скелет», а индекс хиральности характеризует, в первую очередь, асимметрию молекулы. Очевидно, что глобула обладает большей симметрией, чем вытянутая полипептидная цепь. Уменьшение энтропии при больших значениях модуля индекса хиральности может быть связано как с особенностями расчета, так и с тем, что использованная мера хиральности аддитивна и связана с электронной структурой молекулы, а энтропия аддитивна, но связана с доступным фазовым объемом для атомов, составляющих молекулу, то есть является конфигурационной характеристикой. Этот вопрос требует дальнейших исследований.

Заключение. Основной задачей данной работы был поиск корреляции между значением индекса хиральности и энтропией системы. В численном эксперименте была получена явная зависимость между модулем индекса хиральности и энтропией системы, которая согласуется с изменением симметрии в процессе фолдинга белка. Уточнение полученной взаимосвязи индекса хиральности и энтропии требует дальнейших исследований, после чего она сможет быть использована в качестве дополнительного предиктора в задачах виртуального скрининга лекарств, поиска путей реакции, а также оценки взаимодействия между белком и лигандом.

Список литературы / References:

1. Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Жаворонков А.А. Хиральность как проблема биохимической физики. *Рос. хим. журнал*, 2007, т. 51, № 1, с. 13-23. [Tverdislov V.A., Yakovenko L.V., Zhavoronkov A.A. Chirality as a problem of biochemical physics. *Ros. khim. zhurnal*, 2007, vol. 51, no. 1, pp. 13-23 (In Russ.)]
2. Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Ивлиева А.А., Твердислова И.Л. Ионная и хиральная асимметрии как физические факторы биогенеза и онтогенеза. *Вестник Моск. ун-та. Сер. 3: Физика, астрономия*, 2011, № 2, с. 3-13.

[Tverdislov V.A., Yakovenko L.V., Ivlieva A.A., Tverdislova I.L. Ionic and chiral asymmetries as physical factors of biogenesis and ontogenesis. *Vestnik Mosk. un-ta. Ser. 3: Fizika, astronomiya*, 2011, no. 2, pp. 3-13 (In Russ.)]

3. Твердислов В.А., Малышко Е.В., Ильченко С.А., Жулябина О.А., Яковенко Л.В. Периодическая система хиральных структур в молекулярной биологии. *Биофизика*, 2017, т. 62, вып. 3, с. 421-434. [Tverdislov V.A., Yakovenko L.V., Ivlieva A.A., Tverdislova I.L. Ionic and chiral asymmetries as physical factors of biogenesis and ontogenesis. *Vestnik Mosk. un-ta. Ser. 3: Fizika, astronomiya*, 2011, no. 2, pp. 3-13 (In Russ.)]

4. Zabrodsky H., Peleg S., Avnir D. Continuous symmetry measures, IV: chirality. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, no. 1, pp. 462-473.

5. Petitjean M. Chirality and symmetry measures: a transdisciplinary review. *Entropy*, 2003, vol. 5, pp. 271-312.

6. Osipov M.A., Pickup B.T., Fehervari M., Dunmur D.A. Chirality measure and chiral order parameter for a two-dimensional system. *Molecular Physics*, 1998, vol. 94, no. 2, pp. 283-287.

7. Luzanov A.V., Nerukh D. Simple one-electron invariants of molecular chirality. *J. Math. Chem*, 2007, vol. 41, no. 4, pp. 417-435.

8. Neidigh J.W., Fesinmeyer R.M., Andersen N.H. Designing a 20-residue protein. *Nature Struct. Mol. Biol.*, 2002, vol. 9, pp. 425-430.

9. Chowdhury S., Lee M.C., Xiong G., Duan Y. Ab initio folding simulation of the Trp-cage mini-protein approaches NMR resolution. *J. Mol. Biol.*, 2003, vol. 327, pp. 711-717.

10. Lin S.-K. Correlation of entropy with similarity and symmetry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1996, vol. 36, pp. 367-376.

ЭПР-СПЕКТРОСКОПИЯ БИОГЕННЫХ КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ОКСИДОВ ЖЕЛЕЗА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ.

Юртаева С.В.¹, Ефимов В.Н.², Сальников В.В.³

¹ Казанский физико-технический институт КазНЦ РАН
ул. Сибирский тракт, 10/7, г. Казань, 420029, РФ
e-mail: s.yurtaeva@kfti.knc.ru

² ИФМБ, Казанский федеральный университет
ул. Кремлевская, 18, г. Казань, 420008, РФ
e-mail: vefimov.51@mail.ru

³ Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН
ул. Лобачевского, 2/31, г. Казань, 420011, РФ
e-mail: salnikov_russ@yahoo.com

Аннотация. Изучено поведение сигналов ЭМР в биологических тканях различного происхождения (ткани крыс с моделями различных патологий, ткани злокачественных опухолей, ткани нервного ганглия и ткани сердца виноградной улитки) в широком диапазоне температур. Проанализированы характеристики сигналов ЭМР в перечисленных тканях. Установлены общие характеристики сигналов ЭМР, которые в большинстве случаев свидетельствуют об образовании кристаллов магнетита в тканях: характерное немонотонное температурное поведение резонансного поля, ширины линии и интегральной интенсивности, наличие аксиальной и кубической компонент в анизотропии резонансного поля. Обнаружен Фазовый переход Вервея. При температурах выше температуры фазового перехода Вервея обнаруживается корреляция величин ширины линии и резонансного поля с параметром магнетокристаллической анизотропии магнетита. Обнаружены различные типы анизотропного поведения резонансного поля, характеризующие различную геометрию кристаллических включений. Описанные сигналы ЭМР в биологических тканях и крови могут быть использованы для детектирования аномального накопления железа в кристаллической форме.

Ключевые слова: Биоминерализация железа, ЭПР-спектроскопия, сигналы ЭМР, ферритин, ферригидрит, магнетит.