

УДК: 577.332:544.272

## Моделирование спирализации пептидов, содержащих в своем составе аспарагиновую или глутаминовую кислоту

М. С. Кондратьев<sup>а</sup>, А. В. Кабанов, В. М. Комаров

Учреждение Российской академии наук Институт биофизики клетки РАН,  
142290, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3

E-mail: <sup>а</sup>ma-ko@bk.ru

Получено 16 марта 2010 г.

В данной работе при помощи методов молекулярной динамики и квантовой химии изучается механизм инициирования альфа-спирализации пептидных последовательностей. Показано, что ключевой вклад в запуск этого процесса вносят кислые аминокислотные остатки, расположенные на N-конце пептидной цепи. Полученные результаты не противоречат известным экспериментальным и статистическим данным и существенно дополняют имеющиеся в настоящее время представления о процессах, происходящих на ранних стадиях сворачивания пептидов и белков.

Ключевые слова: альфа-спираль, пептиды, аминокислотные остатки, молекулярная динамика, квантовая химия, водородная связь

### Modeling of helix formation in peptides containing aspartic and glutamic residues

M. S. Kondratyev, A. V. Kabanov, V. M. Komarov

*Institute of Cell Biophysics RAS, 3 Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia*

**Abstract.** – In present work we used the methods of molecular dynamics simulations and quantum chemistry to study the concept, according to which aspartic and glutamic residues play a key role in initiation of helix formation in oligopeptides. It has been shown, that the first turn of the alpha-helix can be organized from various amino acid sequences with Asp and Glu residues on the N-terminus. Thermodynamic properties of such a process were analyzed. The obtained results do not interfere with known experimental and statistical data and they substantially elaborate present views on the processes of early peptide folding stages.

Keywords: alpha-helix, amino acids, molecular dynamics simulation, quantum chemistry, H-bonding

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2010, vol. 2, no. 1, pp. 83–90 (Russian).

## Введение

Детальное описание механизма (или набора механизмов) сворачивания молекул белков до настоящего времени является одной из важнейших задач как классической протеомики, так и современной молекулярной инженерии [Степанов, 1996; Глик, Пастернак, 2002]. Установлено, что белки синтезируются на рибосоме в направлении от N- к C-концу полипептидной цепи, причем времена синтеза даже малых белков оказываются на порядки большими, чем времена структурных перестроек полипептидной цепи [Jones et al., 1993; Eaton et al., 1997; Колб, 2001]. Известно также, что в процессе биосинтеза полипептидов именно N-конец цепи первым выходит в раствор, и это дает возможность начать образование «зародышевых» альфа-спиралей на N-конце аминокислотной последовательности не дожидаясь полного синтеза цепи [Eaton et al., 1997; Колб, 2001; Cochran et al., 2001; Iqbalsyah, Doig, 2004].

Однако при всем многообразии экспериментальных и теоретических данных, свидетельствующих о важной роли стерических факторов, гидрофобности, электростатических взаимодействий и других характеристик в организации альфа-спиралей, уникальный, зависящий от аминокислотной последовательности физический механизм образования альфа-спирали всё ещё требует значительного уточнения.

Цель данного исследования заключается в том, чтобы на основе изученных нами ранее особенностей электронного строения отдельных аминокислотных остатков [Кондратьев и др., 2005] и 20-ти простейших монопептидов [Кондратьев и др., 2007] детализировать физический механизм сворачивания альфа-спирали и, в частности, обосновать возможность инициирования спирализации олигопептидной цепи кислыми аминокислотными остатками – аспаргатом и глутаматом. Именно они, как показывает статистика распределения аминокислот в альфа-спиральных участках белков, чаще остальных расположены непосредственно в начале (в так называемой «*N-cap*» зоне) спиралей или за 1–2 остатка от условных границ спиралей (табл. 1.) [Финкельштейн, Птицын, 2002].

Таблица 1

Статистика встречаемости 20-ти аминокислотных остатков  
в различных элементах вторичных структур белков

А.к. ост.	Наличие		число γ	Диполь/заряд	pK	Яркая тенденция быть в:														
	NH	C <sup>β</sup>				до		спираль		за		ядро								
						α <sub>N</sub>	α <sub>N</sub>	α	α <sub>C</sub>	α <sub>C</sub>	β									
Gly	✓																			
Ala	✓	✓						+												
Pro		✓	1					+	-	-	-	-	-	-						+
Glu	✓	✓	1	COOH ⇒ CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	4.3			+	+											
Asp	✓	✓	1	COOH ⇒ CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	3.9			+	+											
Gln	✓	✓	1	OCNH <sub>2</sub>																
Asn	✓	✓	1	OCNH <sub>2</sub>				+												
Ser	✓	✓	1	OH				+												
His	✓	✓	1	NH <sub>2</sub> и N ⇒ NH <sup>+</sup>	6.5															
Lys	✓	✓	1	NH <sub>2</sub> ⇒ NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	10.5															
Arg	✓	✓	1	HNC(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	12.5															
Thr	✓	✓	2	OH				+												
Ile	✓	✓	2																	
Val	✓	✓	2																	
Leu	✓	✓	1																	
Met	✓	✓	1																	
Phe	✓	✓	1																	
Tyr	✓	✓	1	OH ⇒ O <sup>-</sup>	10.1															
Cys	✓	✓	1	SH ⇒ S <sup>-</sup>	9.2															
Trp	✓	✓	1	NH																

Ранее нами было показано, что у основного конформера аспартатного и глутаматного монопептида имеет место исходное «закручивание» остова молекулы с углами  $\varphi$  и  $\psi$  уже близкими к параметрам правой альфа-спирали. Такое изменение геометрии молекулы объясняется образованием энтальпийно- и энтропийно-выгодной вилочковой, бифуркационной водородной связи [Jeffrey, Saenger, 1991] между боковой группой кислого аминокислотного остатка и HN-группами основной цепи. Было также замечено, что количество таких вилочковых водородных связей, изменяющих геометрию остова цепи и повышающих стабильность спирали в целом, увеличивается при появлении в боковой группе «затравочного», кислого аминокислотного остатка отрицательного заряда [Vila et al., 2002; Gnanakaran et al., 2003; Garcia, Sanbonmatsu, 2002]. По этой причине пептидные цепи, содержащие именно депротонированные кислые аминокислотные остатки, стали основными объектами наших исследований.

## Модели и методы

Конформационные, термодинамические и электростатические свойства модельных олигопептидов анализировались с использованием квантово-химического полуэмпирического метода PM3 [Stewart, 1989a, b], а также методов молекулярной динамики (МД) [Шайтан, Терёшкина, 2004; Jorgensen, 1998] в силовом поле OPLS [Kaminski et al., 2002; Kaminsky et al., 2001]. В качестве моделей для изучения механизма инициирования «прямой» альфа-спирализации нами рассматривались изолированные олигопептиды длиной от 2 до 16 остатков различной природы, содержащие в своем составе аспартат и глутамат на N-конце цепи. Расчет изолированных систем позволил нам изучить поведение «чистой» аминокислотной последовательности – с целью показать именно вклад конкретных аминокислотных остатков в спирализацию пептидов.

Перед началом расчета МД-траектории, описывающей «прямую» спирализацию, изолированную структуру каждой молекулы оптимизировали в том силовом поле, с помощью которого предполагалось вести дальнейшую работу. Время рассмотрения процесса молекулярной динамики ограничивалось 100 пикосекундами (пс), шаг равнялся 0.001 пс. Рабочая температура и давление были взяты, соответственно, 310К и 1 атм. Выбор указанного промежутка времени основан на том, что в 16-членной цепочке из аспартата и аланинов (калибровочный расчет) первые витки спирали образовывались примерно через 60–70 пс, а регуляризация всей структуры заканчивалась к 100 пс. В случае октапептидов (а также 12-членных цепочек) первые витки образовывались уже за 45–50 пс, а спирализация заканчивалась где-то через 80 пс. На остальном протяжении траектории МД-расчета в молекулах наблюдались лишь небольшие флуктуации структуры по углам  $\varphi$  и  $\psi$ , что проявлялось во вращательных подвижках межвитковых водородных связей около положений равновесия.

Последующее разбиение 100 пс траектории динамики на отрезки по 10 пс и расчет каждой из стадий с помощью квантово-химической техники позволяли оценить последовательный вклад энтальпийных и энтропийных факторов в процесс спирализации олигопептидов.

## Результаты

Анализ рассчитанных траекторий молекулярной динамики всех предложенных модельных систем подтвердил нашу гипотезу о ключевой роли заряженных кислых аминокислотных остатков (аспартата и глутамата) в запуске свертывания альфа-спирали. Один из интермедиатов спирализации (с уже сформировавшимися на N-конце последовательности вилочковыми водородными связями между атомами кислорода боковой группы аспартата и группами Н-Н основной цепи аланинового октапептида) приведен на рисунке 1. Молекулярно-динамические расчеты показали, что переход остова молекулы из полностью развернутой конформации к форме с уже сформировавшимся первым «завитком» альфа-спирали происходит в течение первых двух десятков пикосекунд. За эти времена в области кислого аминокислотного остатка происходит образо-

вание вилочковых водородных связей, которые меняют значения углов  $\varphi$  и  $\psi$  остова цепи и этим значительно облегчают включение последующих остатков в состав альфа-спирали.

Представлялось разумным предположить, что в ходе сворачивания указанные геометрические перестройки молекулы октапептида компенсировались существенным понижением энергии системы – и это было подтверждено нами в ходе последующих расчетов термодинамических характеристик моделируемого процесса (рис. 2): полная энергия спирализующегося пептида только за первые 20 пс расчета понижается на 85–90 ккал/моль.

Для того чтобы еще более детализировать энергетические параметры процесса спирализации (с точки зрения изменения свойств электронной структуры молекулы), мы разделили всю траекторию МД-динамики на участки по 10 пс, после чего выделили конформеры, отвечающие этим точкам, и провели для них соответствующие квантово-химические расчеты.

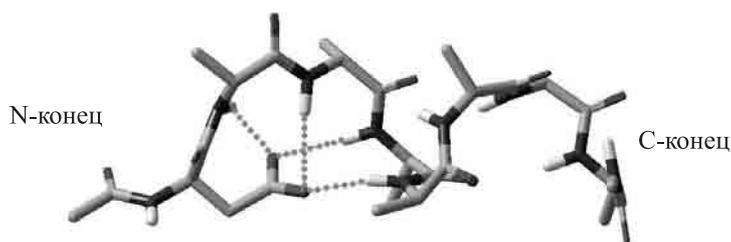


Рис. 1. РМ3-оптимизированный интермедиат спирализации аланинового октапептида. На N-конце последовательности уже образовались вилочковые водородные связи

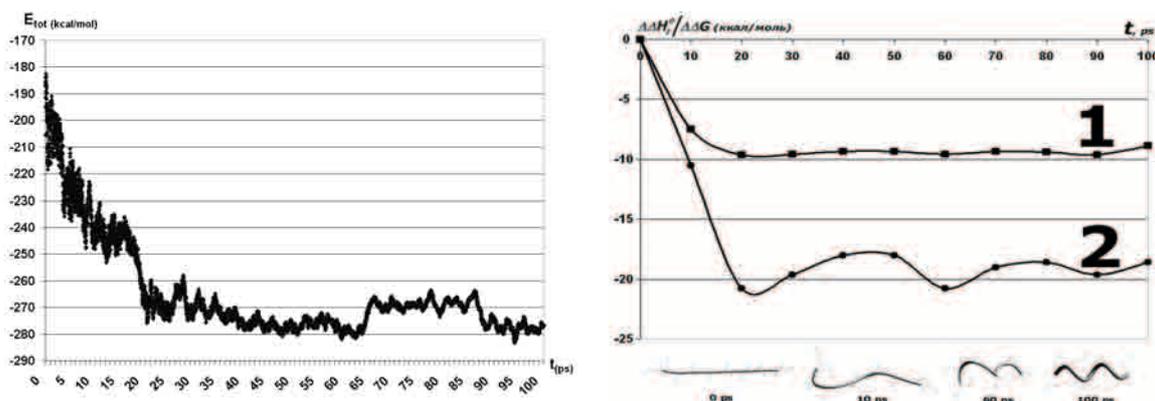


Рис. 2. Уменьшение полной энергии (график слева, МД), а также свободной энергии (1) и теплоты образования (2) (график справа, РМ3) системы в процессе альфа-спирализации аланинового октапептида, первый остаток которого на N-конце заменен на аспарат

Оказалось, что и РМ3-оптимизированные, и рассчитанные методом молекулярной динамики структуры интермедиатов альфа-спирализации достаточно близки геометрически, что позволяет распространить РМ3-оценки термодинамических и спектральных свойств таких конформеров на все рассмотренные этапы процесса спирализации. При этом, как показал квантово-химический расчет, разные стадии процесса «закручивания» пептида характеризуются и разным видом спектра нормальных колебаний соответствующих конформеров, особенно это касается низкочастотных мод. Так, если для начального состояния олигопептида – состояния вытянутой цепочки – длинноволновая граница спектра нормальных колебаний лежит в области очень низких частот, порядка  $5 \text{ см}^{-1}$ , то для конформера 20 пикосекундной молекулярной динамики, где начинают формироваться внутримолекулярные водородные связи, эта граница мод уже сдвигается в область  $10 \text{ см}^{-1}$ . Для полностью организованной альфа-спиральной структуры сформировавшейся сеткой водородных связей граница спектра перемещается еще дальше в высокочастотную область и лежит уже в районе  $20 \text{ см}^{-1}$ .

Поскольку наибольший вклад в термодинамику колебательных процессов вносят, как известно, самые низкочастотные моды, то согласно полученным данным ясно, что в рассматриваемой кинетике спирализации олигопептида состояние колебательной энтропии играет значительную роль.

Приведенные графики позволяют отметить, что в течение первых 20 пс процесса наблюдается резкий уход в область отрицательных значений не только энтальпии образования системы, но и ее свободной энергии. Это связано с началом формирования большого количества внутримолекулярных водородных связей в области аспартата. Дальнейший выход энтальпийной кривой 2 (рис. 2, правая часть) в затухающую колебательную фазу отражает процесс завершения регуляризации межвитковых водородных связей с небольшими флуктуациями геометрии уже спирализованного остова олигопептида около положения равновесия. В целом, из сравнения графиков 1 и 2 (рис. 2, правая часть) можно сделать вывод, что энтропийная составляющая процесса действительно оказывается немалой: хотя изменение гиббсовской энергии и остается симпатным изменению энтальпии образования, все же график изменения свободной энергии имеет более пологий характер, что свидетельствует о важном вкладе энтропийного фактора в процесс организации альфа-спиралей.

С целью дальнейшего обоснования высказанной гипотезы о ключевой роли кислых аминокислотных остатков в формировании первого завитка альфа-спирали и запуске на N-конце последовательности «прямой» альфа-спирализации нами были рассчитаны траектории молекулярной динамики и для других пептидов линейного строения и различного состава – как с обязательным включением на N-концах молекул остатков аспартата или глутамата, так и без них. Изменения структуры таких молекул по прошествии 100 пс представлены на рисунке 3.

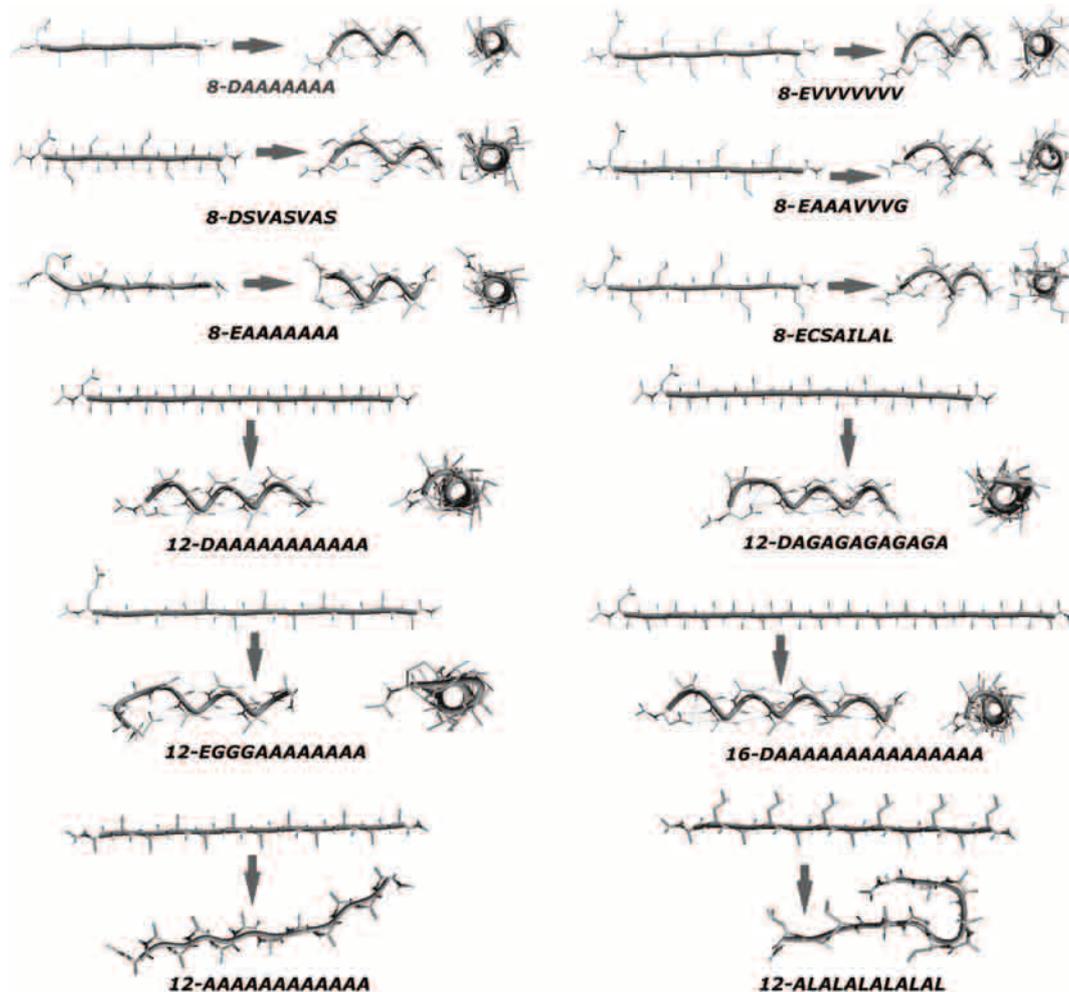


Рис. 3. Исходные развернутые цепочки олигопептидов и структуры этих же молекул после 100 пс МД-расчета. Вид сбоку и с торца; две нижние молекулы лишены инициаторов спирализации и не претерпели кардинальных геометрических изменений

Анализ полученных траекторий молекулярной динамики указанных систем подтвердил важную роль кислых аминокислотных остатков в инициировании альфа-спирализации линейных пептидов. Во всех случаях при наличии в структуре олигопептида остатков аспарагиновой или глутаминовой кислот наблюдалось образование вилочковых водородных связей и, по прошествии 70–80 пс, образование устойчивых витков альфа-спирали. Сам же остаток, инициирующий такие перестройки, оказывался в итоге на N-конце цепи, что находится в полном соответствии с экспериментальными данными (табл. 1).

Необходимо отметить, что олигопептиды без остатков аспартата и глутамата, т. е. полностью лишенные «точек запуска» процесса спирализации, за время 100 пс молекулярной динамики витков альфа-спирали так и не образовали (рис. 3, два нижних случая). Это является еще одним подтверждением важной роли «затравочных» аминокислот для спирализации цепи или по крайней мере для значительного ускорения этого процесса – так как из литературы известны экспериментальные данные о том, что и чистые полиаминокислотные цепочки аланина [Takano et al., 1999] или смешанного состава [Hummer et al., 2001], в принципе, могут образовывать альфа-спирали. Однако стабильность таких спиралей остается предметом дискуссии [Ireta et al., 2005]. Процесс их образования носит в значительной степени спонтанный характер, требует на порядки большего времени [Takano et al., 1999; Hummer et al., 2001], и, что самое главное, его существование не объясняет наблюдаемые статистические закономерности по встречаемости аминокислотных остатков (табл. 1).

В литературе также имеются сведения о том, что в результате замен в белках кислых аминокислотных остатков на аланин и другие алифатические аминокислоты степень спиральности протеинов обычно сильно снижается [Пермяков, Пермяков, 2000; Zagrovic et al., 2002; Ananda et al., 2005], откуда тоже можно сделать вывод о важной роли кислых аминокислотных остатков в формировании альфа-спиралей.

Таким образом, из сравнительного анализа результатов наших расчетов и имеющихся литературных данных вытекает возможность реализации следующего механизма формирования первого витка альфа-спирали. Геометрия основной цепи молекулы изменяется сначала в области остатка аспартата или глутамата – вследствие образования вилочковых водородных связей (между атомами кислорода боковой группы кислой аминокислоты и группами H–N основной цепи пептида), которые значительно облегчают включение последующих (в направлении от «затравки» к C-концу пептида) остатков в состав альфа-спирали.

Вероятно, что изменение геометрии остова полипептидной цепи при инициировании спирализации преодолевает некоторый энергетический барьер, который будет определять скорость образования первого витка спирали. Расчет этого параметра представляется важным для более полного понимания процесса спирализации и будет описан в наших последующих работах.

## Заключение

В работе проанализирован один из возможных типов альфа-спирализации пептидной цепи – «прямая», которую инициируют кислые аминокислотные остатки (аспарагиновая и глутаминовая) на N-конце последовательности, и даны термодинамические характеристики такого процесса. Вместе с тем существует, по-видимому, и другой тип спирализации, «обратная», которая может стартовать на C-конце пептидной цепи – в результате образования вилочковых водородных связей боковыми группами аргинина, лизина и гистидина (см. табл. 1.) [Кондратьев и др., 2008]. Работа, посвященная изучению такого типа спирализации, уже готовится авторами в печать.

## Список литературы

Ananda K, Vasudev P. G., Sengupta A., Raja K. M. P., Shamala N., Balaram P. Polypeptide helices in hybrid peptide sequences // JACS 2005, V. 127, P. 16668–16674.

- Cochran D. A. E., Penel S. and Doig A. J.* Effect of the N1 residue on the stability of the alpha-helix for all 20 amino acids // *Protein Science*. 2001. V. 10. P.463–470.
- Eaton W. A, Muñoz V., Thompson P. A., Chan C. K., Hofrichter J.* Submillisecond kinetics of protein folding // *Curr.Opin.Struct.Biol*. 1997. V. 7. P. 10–14.
- García A. E, Sanbonmatsu K. Y.* Alpha-helical stabilization by side chain shielding of backbone hydrogen bonds // *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 2002. V. 99. P.2782–2787.
- Gnanakaran S., Nymeyer H., Portman J., Sanbonmatsu K.Y., García A.E.* Peptide folding simulations // *Curr.Opin.Struct.Biol*. 2003. V.13. P. 168–174.
- Hummer G., García A. E., Garde S.* Helix nucleation kinetics from molecular simulations in explicit solvent // *Proteins*. 2001. V. 42. P. 77–84.
- Iqbalsyah T. M. and Doig A. J.* Effect of the N3 residue on the stability of the alpha-helix // *Protein Science*. 2004. V. 3. P. 32–39.
- Ireta J, Neugebauer J, Scheffler M, Rojo A, Galván M.* Structural transitions in the polyalanine alpha-helix under uniaxial strain. *J Am Chem Soc*. 2005 Dec 14; 127(49):17241–4.
- Jeffrey G., Saenger W.* Hydrogen bonding in biological structures // Springer-Verlag. 1991. 569 P.
- Jones C. M., Henry E. R., Hu Y, Chan C. K., Luck S. D., Bhuyan A., Roder H., Hofrichter J., Eaton W. A.* Fast events in protein folding initiated by nanosecond laser photolysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 11860–11864.
- Jorgensen W. L.* // In *Encyclopedia of Computational Chemistry* / Ed. P.v.R Schleyer, – New York: Wiley, 1998. V. 3. P. 1986.
- Kaminski G. A., Stern H. A., Berne B. J., Friesner R. A., Cao Y. X., Murphy R. B., Zhou R., Halgren T. A.* Development of a polarizable force field for proteins via ab initio quantum chemistry: First generation model and gas phase tests // *J. Comput. Chem*. 2002. V. 23. Iss. 16. P. 1515–1531.
- Kaminski G. A., Friesner R. A., Tirado-Rives J. and Jorgensen W. L.* Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides // *J. Phys. Chem. B*. 2001. V. 105. P. 6474–6487.
- Stewart J. P.* “Optimization of Parameters for Semiempirical Methods. I. Method” // *J. Comput. Chem*.1989. V. 10. P. 209–220.
- Stewart J. P.* “Optimization of Parameters for Semiempirical Methods. II. Applications” // *J. Comput. Chem*.1989. V. 10. P. 221–264.
- Takano M., Yamato T., Higo J., Suyama A., and Nagayama K.* Molecular dynamics of a 15-residue poly(L-alanine) in water: Helix formation and energetics // *JACS*. 1999. V. 121. P. 605–612.
- Vila J. A., Ripoll D. R., Scheraga H. A.* Physical reasons for the unusual alpha-helix stabilization afforded by charged or neutral polar residues in alanine-rich peptides // *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 2002. V. 97. P. 13075–13079.
- Zagrovic B., Snow C. D., Shirts M. R. and Pande V. S.* Simulation of Folding of a small alpha-helical protein in atomistic detail using worldwide-distributed computing // *J. Mol. Biol*. 2002, V. 323, P. 927–937.
- Глик Б., Пастернак Дж.* Молекулярная биотехнология (принципы и применение). – М.: Мир, 2002.
- Колб В. А.* Котрансляционное сворачивание белков // *Молекулярная биология*. 2001. Т. 35, № 4. С. 682–690.
- Кондратьев М. С., Кабанов А. В., Комаров В. М.* «Обратная» альфа-спирализация олигопептидов и факторы, ее запускающие». Тезисы 12-ой Международной Пушинской школы-конференции «Биология – наука XXI века». Пушкино, 2008, С. 33.
- Кондратьев М. С., Кабанов А. В., Комаров В. М.* «Спиралеобразующие» конформеры в структурной организации метиламидов N-ацетил-альфа-L-аминокислот. Квантово-химический РМЗ анализ // *Биофизика*. 2007. Т. 52. № 3. С. 401–408.
- Кондратьев М. С., Самченко А. А., Комаров В. М., Кабанов А. В.* Некоторые аспекты структуры и конформационной лабильности природных L-аминокислот и модельных олигопептидов // «Математика. Компьютер. Образование». 2005. Том 12. С. 899–916.

- Пермяков С. Е., Пермяков Е. А.* Использование методов белковой инженерии в исследовании кальцийсвязывающих белков // *Биофизика*. 2000. Т. 45. Вып. 6. С. 990–1006.
- Степанов В. М.* Молекулярная биология. Структуры и функции белков. – М.: Высшая Школа, 1996.
- Финкельштейн А. В., Птицын О. Б.* Физика белка. – М.: Книжный дом «Университет», 2002.
- Шайтан К. В., Терёшкина К. Б.* Молекулярная динамика белков и пептидов. Методическое пособие. М: МГУ, 2004.