

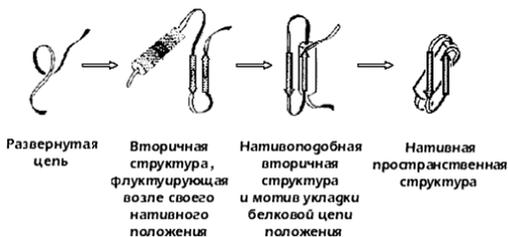
ОЦЕНКА РОЛИ АСПАРТАТНЫХ И ГЛУТАМАТНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ В СПИРАЛИЗАЦИИ СТРУКТУРЫ МОДЕЛЬНЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ

Кондратьев М. С., Кабанов А. В., Комаров В. М.

(Россия, Пущино)

В работе, исходя из результатов полуэмпирических квантово-химических и молекулярно-динамических расчетов, выдвигается идея о том, что для запуска спирализации олигопептидной цепи чрезвычайно важно наличие в ее структуре аспарагиновой или глутаминовой кислоты. Показано: как с образованием первого витка альфа-спирали может организовываться спиральная форма различных аминокислотных последовательностей. Анализируются термодинамические характеристики интермедиатов такого процесса.

Введение. Исследование влияния состава аминокислотной последовательности на образование того или иного типа вторичной структуры белка является одной из самых актуальных задач как классической протеомики, так и современной молекулярной биофизики [1,2].



Стадийная модель сворачивания белка по О.Б.Птицину (1973).
Выделены вторичные структуры — α -спирали (цилиндры) и β -участки (стрелки).

Согласно весьма распространенной гипотезе сворачивания белка, так называемой «каркасной модели» [3,4] считается, что для ранних стадий фолдинга полипептидной цепи характерно наличие в структуре зародышевых форм альфа-спиралей и бета-шпилек (см. схему). При этом, как известно, в основной массе глобулярных белков одним из преимущественных типов вторичной структуры оказывается правая α -спираль.

Однако, несмотря на большой объем накопленных данных по структуре и свойствам отдельных стадий сворачивания белков, все же ряд ключевых моментов остается без ответа, например, вопрос о том, каким образом на том или ином месте полипептидной цепи начинают формироваться участки с альфа- или бета-структурой [5].

Ранее нами на основе квантово-химических полуэмпирических РМЗ расчетов были проанализированы структурные, спектральные и термодинамические особенности метиламидов N-ацетил-аминокислот и было установлено, что у основного конформера аспартатного и глутаматного монопептида имеет место «закручивание» остова с углами φ и ψ [6] уже близкими к параметрам правой α -спирали. Вполне возможно, что такая исходная «предрасположенность» молекул монопептидов аспартата и глутамата к образованию спиральной геометрии остова полипептидной цепи выдвигает эти остатки в класс «модуляторов фолдинга» α -спиралей.

Цель данной работы заключается в том, чтобы на основе молекулярно-динамических и квантово-химических расчетов дать обоснование возможности эффективной организации спиральной формы коротких олигопептидов через включение в их состав в качестве «затравочных» центров именно этих двух аминокислот - аспартата (Asp) и глутамата (Glu).

Метод исследования. Структурные, спектральные и термодинамические свойства ряда олигопептидов рассчитывались с использованием квантово-химического полуэмпирического РМЗ метода [7,8], а также техники молекулярной динамики (МД) [9,

10] в различных вариантах силовых полей AMBER99 [11], CHARMM27 [12,13] и OPLS [14, 15]. Рассматривались аминокислотные последовательности длиной от 2 до 16 остатков разной природы, содержащие в своем составе аспартат и глутамат.

Результаты и обсуждение.

PM3 конформационный расчет коротких ди-, три-, тетра- и пентапептидов показал, что выделяемая нами существенная роль внутримолекулярной водородной связи в стабилизации «спиральной закрутки» молекулярного остова молекул аспартата (Asp, D) и глутамата (Glu, E) (а также их монопептидов) сохраняет свою важность и здесь. В случае олиопептидов такое водородное связывание приобретает уже множественный, бифуркационный характер. Наиболее четко он проявляется в том случае, когда карбоксильная группа аспартата или глутамата существует в депротонированной форме, т.е. когда оба атома кислорода этой группы могут активно вовлекаться во внутримолекулярные водородные связи.

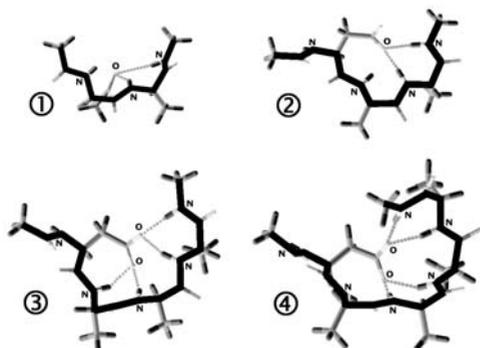


Рис.1. Формирование начала витка α -спирали в ряду олигопептидов: DA^- (1); DAA^- (2); $DAAA^-$ (3); $DAAAA^-$ (4).

На рисунке 1, в качестве примера, представлены результаты оптимизационного PM3 расчета структуры изолированных олигопептидов аланиновой природы $D(A_n)$, где $n = 2 \div 4$, с депротонированным аспартатом в начале цепи. Видно, что именно бла-

годаря бифуркационным водородным связям, образованным заряженной карбонильной группой аспартата, основная цепь таких пептидов становится все более и более «закрученной» - с увеличением числа остатков.

Условная спиральность была получена и для второй «затравки» – глутамата (Glu), который тоже имеет в своем составе карбоксильную группу и поэтому в депротонированной форме он также обладает устойчивой изначальной «закруткой» своего молекулярного остова. Пример формирования начала витка правой α -спирали глутаматным пептидом (EAAAA) показан на рисунке 2.

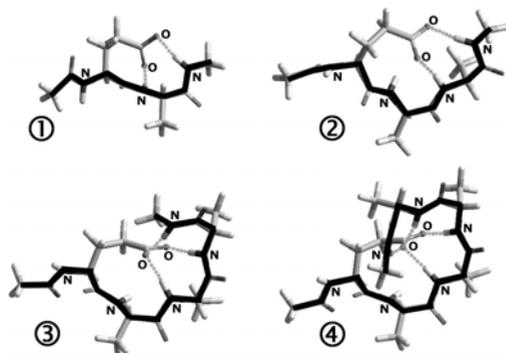


Рис.2. Формирование начала витка α -спирали в ряду олигопептидов: EA⁻ (1); EAA⁻ (2); EAAA⁻ (3); EAAAA⁻ (4).

В дальнейшем схожие результаты были получены в случае октапептидов - DAAAAAAAA и EAAAAAAAA, также РМЗ-оптимизированных (рис.3). Видно, что здесь, на уровне организации всего двух витков, спиральная форма олигопептида уже весьма устойчива. При этом величины торсионных углов φ и ψ в регулярной спиральной части молекулы DAAAAAAAA оказываются лежащими, соответственно, в пределах от -60° до -70° и в пределах от -30° до -40° , и это согласуется как с расчетами других авторов [16, 17], так и с экспериментальными данными по эти углам в канонических α -спиралях [18 - 22].

тенденцией всегда находиться в пределах 2-х - 3-х остатков, от N-конца спирали. Такое «пограничное» положение Asp, как мы видим, не исключает его активного влияния на организацию регулярной спиральной структуры идущих за ним аминокислотных остатков цепи.

С целью более наглядного представления процесса спирализации длинных олигопептидных цепочек в работе были выполнены молекулярно-динамические (МД) расчеты различных вариантов аминокислотных последовательностей. Были использовали популярные пакеты программ Nuregchem [28] и TINKER [29], в вариантах наиболее востребованных потенциалов валентно-силовых полей: AMBER, CHARMM, OPLS. Изучалась спирализация олигопептидов, состоящих из восьми-, двенадцати- и шестнадцати остатков глицина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, цистеина, с различным местоположением аспаратного или глутаматного остатка. Также нами были рассмотрены гетероаминокислотные последовательности включающие как спиралеобразующие, так и спиралеразрушающие остатки (8-EAAVVVG, 8-DSVASVAS, 8-ECSAILAL и 12-DAGAGAGAGAGA), а также цепочки, на N-конце которых отсутствовали кислые аминокислоты Asp и Glu (например, полиаланин) и цепочки состоящие из чередующихся остатков аланина и валина.

Перед началом расчета МД-траектории структуру каждой молекулы оптимизировали в том силовом поле, с помощью которого предполагалось вести дальнейшую работу. Время рассмотрения процесса динамики ограничивалось 100 ps, шаг равнялся 0.001 ps. Рабочая температура и давление были взяты, соответственно, 310⁰ K 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 уже через 60-70 ps, а регуляризация всей структуры закачивалась к 100 ps. В случае октапептидов (а также 12-членных цепочек) первые витки образовывались уже за 45-50 ps, а спирализация заканчивалась примерно через 80 ps. В последующие времена в молекулах наблюдались небольшие флуктуации структуры по углам

φ и ψ , что проявлялось во вращательных подвижках межвитковых водородных связей около положений равновесия.

Важно отметить, что наиболее стабильное воспроизведение «сворачивания» указанных молекул в спирали происходит при использовании силового поля OPLS. Хотя эмпирические поля типа AMBER, CHARMM и OPLS были созданы специально для работы с белками и нуклеиновыми кислотами, однако, только параметризация OPLS оказалась более надежной в оценке вкладов нековалентных взаимодействий и потому более адекватной в описании динамики пептидов в газовой фазе [14, 15].

Полученные результаты в иллюстративной форме представлены на рисунке 4. Анализ МД-траекторий всех указанных соединений выявил следующие общие закономерности:

1) Процесс «сворачивания» аминокислотной последовательности в спиральную форму, согласно расчетам, происходит в несколько стадий. Сначала боковая группа кислого остатка (Asp или Glu) «находит» ближайший к ней атом азота основной цепи и, «подтягивается» к нему через водородную связь. После этого, остов цепи изгибаясь формирует дополнительные Н-связи. Очень скоро боковая группа Asp или Glu окружает себя сетью водородных связей, а сам остов оказывается свернутым в своеобразный «завиток». Дальнейшее развитие процесса идет путем достаточно быстрого достраивания и наращивания числа регулярных межвитковых пептидных водородных связей либо до конца цепочки, либо до начала действия какого-нибудь структурного фактора, терминирующего спирализацию.

2) Точка спирализации линейной цепочки определяется местом положения в ней остатка Asp или Glu. Расчет показал, что начало искривления молекулярного остова и образование регулярных межвитковых водородных связей происходят только на остатках, следующих за Asp или Glu в направлении от N- к C-концу. Данный результат вполне совпадает с экспериментально наблюдаемым аналогичным направлением биосинтеза α -спирали белковой цепи на рибосоме [30]. При этом, если мы имеем дело с относительно коротким олигопептидом, например, аланиновым

октапептидом, и в нем Asp оказывается встроенным в середину цепи, то здесь явных витков спирали не возникает. Тем не менее, даже в этом случае можно наблюдать как боковая (заряженная карбоксильная) группа «затравочного» Asp все же координирует вокруг себя через бифуркационные Н-связи пептидные атомы азота оставшихся за ней 3-х аминокислотных остатков цепи, пытаясь таким образом сформировать структуру витка спирали. В случае же более длинной последовательности с Asp в середине цепи, например, 12-мерного полиаланина, полноценные витки спирали всегда наблюдались лишь после Asp, т.е. только в районе С-конца.

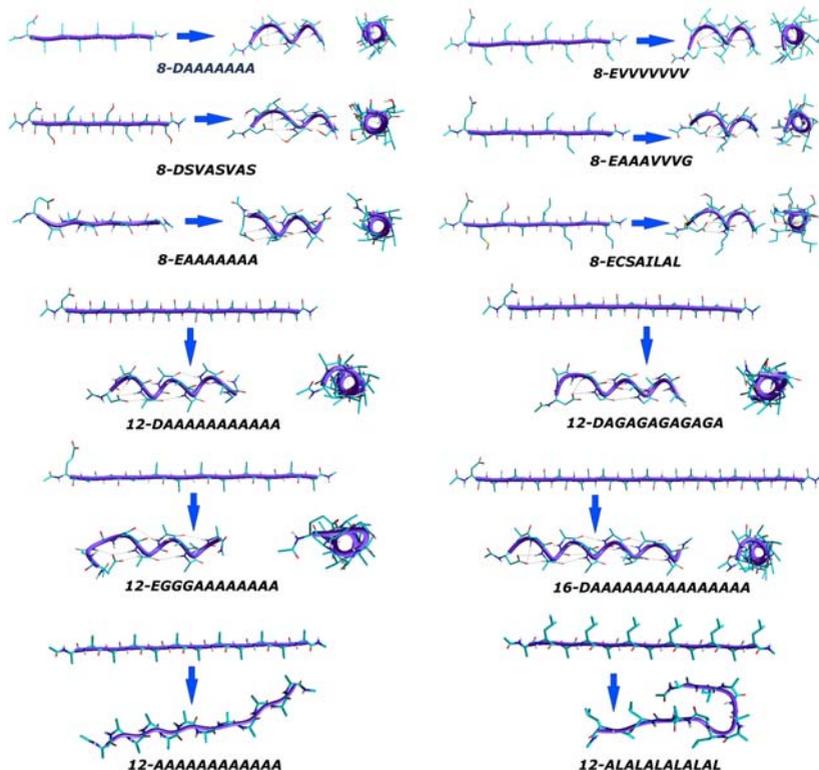


Рис.4. Исходные вытянутые цепочки олигопептидов и их 100-рс свернутые формы. Вид сбоку и с торца.

3) Энергетика процесса спирализации тоже имеет свои особенности. В то время как динамика конформационных превращений исследуемых молекул была хорошо видна и могла быть проанализирована, энергетическая сторона данного вопроса оставалась не совсем ясной. Для того чтобы детализировать процесс спирализации с точки зрения изменения свойств электронной структуры молекулы, мы разделили всю траекторию динамики на участки по 10 ps, после чего выделили конформеры, соответствующие этим точкам, и провели для них необходимые квантово-химические расчеты. Оказалось, что РМЗ-оптимизированные и МД-структуры этих конформеров геометрически достаточно близки, что позволяет распространить РМЗ-оценки термодинамических и спектральных свойств таких конформеров на все рассмотренные этапы процесса спирализации. Отсутствие среди рассматриваемых конформеров метастабильных форм (характеризующихся мнимыми колебательными частотами) дало возможность оценить не только энтальпийные характеристики, но и через формализм статсумм оценить многие энтропийные параметры спирализации. На рисунке 5 приведены изменения теплоты образования и гиббсовой энергии при спирализации молекулы 8-DAAAAAAA.

Обращает на себя внимание резкое изменение энтальпии в течение первых 20 ps процесса (кривая **2**). Такое увеличение термодинамической стабильности системы является отражением начала компактизации молекулы за счет формирования внутриостовных водородных связей в области аспартата. Дальнейший выход энтальпийной кривой **2** в затухающую колебательную фазу отражает процесс завершения регуляризации межвитковых пептидных Н-связей с небольшими флуктуациями геометрии спирализованного остова олигопептида около положения равновесия.

При этом, как показал РМЗ-расчет, разные стадии процесса «закручивания» пептида оказываются характеризуются и разным видом спектра нормальных колебаний соответствующих конформеров. Особенно это касается низкочастотных мод. Так, если для начального состояния олигопептида – состояния вытянутой це-

почки, длинноволновая граница спектра нормальных колебаний лежит в области очень низких частот, порядка 5 см^{-1} , то для конформера 20 пикосекундной молекулярной динамики, где начинают формироваться внутримолекулярные Н-связи, эта граница мод уже сдвигается в область 10 см^{-1} . Для полностью организованной спиральной структуры с формировавшейся сеткой водородных связей граница спектра перемещается еще дальше в высокочастотную область и лежит уже в районе 20 см^{-1} .

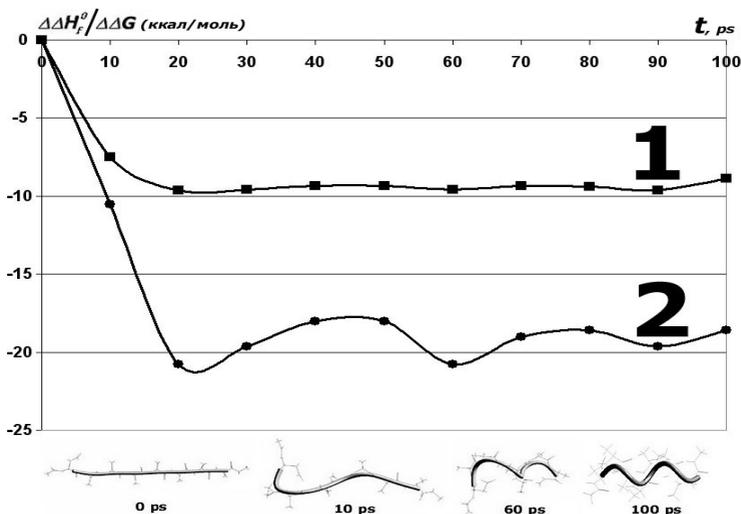


Рис.5. Изменение свободной энергии (1) и теплоты образования (2) в процессе спирализации молекулы 8-DAAAAAAA.

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 должно играть значительную роль. Из графика 1 рис.5 видно, что энтропийный вклад в суммарную энергетику процесса действительно оказывается не малым. При этом, хотя изменения гиббсовой энергии и остается симбатными изменениям энтальпии, но имеет более пологий характер, что свидетельствует о важ-

ном вкладе энтропийного фактора в процессе организации альфа-спиралей.

4) Олигопептиды без остатков Asp и Glu, т.е. полностью лишенные «зародышевых» центров за время 100 пикосекундной МД спирали так и не образовали (рис. 4, два нижних случая), что является подтверждением важной роли кислых аминокислот для спирализации цепи или, по крайней мере, для значительного ускорения этого процесса.

Отметим, что в пользу тезиса о необходимости наличия «затравок» спирализации говорят как данные о предпочтительном содержании остатков аспартата и глутамата в альфа-спиральных участках природных белков, так и результаты направленного мутагенеза

Из многочисленных литературных данных следует, что данные аминокислотные остатки в основном «тяготеют» к N-концам альфа-спиралей [4, 25, 26, 27], причем этот феномен рассматривается не как причина, а как следствие. Между тем, в многочисленных опытах с заменами кислых аминокислотных остатков на аланин и другие альфатические аминокислоты показано, что после такой процедуры степень спиральности протеина сильно снижается. И, хотя авторы таких работ [26, 27, 31] часто делают вывод о некорректности указанной замены, мы предполагаем, что кислые аминокислотные остатки как раз запускают сворачивание альфа-спирали и для сохранения вторичной структуры менять их нельзя.

Заключение. По нашему мнению, образование альфа-спирали из полностью развернутой полипептидной цепи, запускается, вероятно, кислыми аминокислотными остатками – аспартатом и глутаматом. Сам процесс контролируется как энтальпийно, так и энтропийно, и в его основе лежит образование сначала двух, а затем и целой сетки водородных связей, «свивающих» остов цепи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структуры и функции белков. - М.: Высшая Школа, 1996.

2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология (принципы и применение). - М.: Мир, 2002.
3. Птицын О.Б. Стадийный механизм самоорганизации белковых молекул. // Докл. АН СССР, 1973. Т.210, 1213–1215.
4. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка. - М.: Книжный дом «Университет», 2002.
5. Попов Е.М. Проблема белка. Т.3. Структурная организация белка. - М.: Наука, 1997.
6. 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, Т.2, №3 (2007) (принята в печать).
7. Stewart J.P. "Optimization of Parameters for Semiempirical Methods. I. Method" // J. Comput. Chem. 1989. V.10. P. 209-220.
8. Stewart J.P. "Optimization of Parameters for Semiempirical Methods. II. Applications" // J. Comput. Chem. 1989. V.10. P. 221-264.
9. Jorgensen W.L. in Encyclopedia of Computational Chemistry, Schleyer P.v.R, Ed; - Wiley: New York. 1998. V.3. P. 1986.
10. Шайтан К.В., Терёшкина К.Б. Молекулярная динамика белков и пептидов. Методическое пособие. М: МГУ, 2004.
11. Wang J., Cieplak P. and Kollman P. A. How Well Does a Restrained Electrostatic Potential (RESP) Model Perform in Calculating Conformational Energies of Organic and Biological Molecules? // J. Comput. Chem., 2000. V.21. P. 1049-1074.
12. MacKerell, A.D., Jr., Bashford D., Bellot M., Dunbrack R. L., Evanseck J. D., Field M. J., Fischer S., Gao J., Guo H., Joseph-McCarthy D., Ha S., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F. T. K., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D. T., Prodhom B., Reiher W. E., Roux B., Schlenkrich M., Smith J., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiorkiewicz-Kuczera J., and Karplus M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. // J. Phys. Chem. B. 1998. V.102. P. 3586-3616.
13. Foloppe N. and MacKerell A.D., Jr. All-Atom Empirical Force Field for Nucleic Acids: I. Parameter Optimization Based on Small Molecule and Condensed Phase Macromolecular Target Data. // J. Comput. Chem. 2000. V.21. P.86-104.
14. 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.

15. Kaminsky 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.
16. 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.
17. Ananda K, Vasudev P.G., Sengupta A., Raja K.M.P., Shamala N., Balam P. Polypeptide helices in hybrid peptide sequences. // *JACS* 2005, V.127, P.16668-16674.
18. Pauling L., Corey R.B., Branson H.R. The Structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. // *PNAS*. 1951. V.37. P.205-211.
19. Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C. and Sasisekharan, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. // *J. Mol. Biol.* 1963. V.7. P.95-99.
20. Ramachandran, G. N., and Sasisekharan, V. Conformation of polypeptides and proteins. // *Adv. Protein Chem.* 1968. V.23. P.283-437.
21. Leach, S., Nemethy, G. and Scheraga, H.A. Computation of the sterically allowed conformations of peptides. // *Biopolymers*. 1966. V.4. P.369-407.
22. Scott, R.A. and Scheraga, H.A. Conformational analysis of macromolecules. III. Helical structures of polyglycine and poly-L-alanine. // *J. Chem. Phys.* 1966. V.45. P.2091-2101.
23. Bloom S.M., Fasman G.D., de Lozé C., and Blout E.R. The Effect of Amino Acid Composition on the Conformations of Synthetic Polypeptides, Polymers and Copolymers of L-Methionine S-Methyl-L-cysteine and L-Valine. // *JACS*. 1962. V. 84, P. 458-463.
24. Kotelchuk D., Scheraga H.A. The Influence of Short-Range Interactions on Protein Conformation, I. Side Chain-Backbone Interactions within a Single Peptide Unit. // *PNAS*, 1968, Vol.61, 1163-1170.
25. Cook D.A. The relation between amino acid sequence and protein conformation. // *J.Mol.Biol.* V.29., P. 167-171.
26. Cochran D.A.E., Penel S. and Doig A.J. Effect of the N1 residue on the stability of the α -helix for all 20 amino acids // *Protein Science*. 2001. V.10. P.463–470.
27. Iqbalsyah T.M. and Doig A.J. Effect of the N3 residue on the stability of the α -helix. // *Protein Science*. 2004. V.3. P.32–39.
28. <http://www.hyper.com/>
29. <http://dasher.wustl.edu/tinker/>

30. Спири́н А.С. Структура рибосомы и биосинтез белка. - М: Высшая школа, 1986
31. Пермяков С.Е., Пермяков Е.А. Использование методов белковой инженерии в исследовании кальций-связывающих белков. // Биофизика. 2000. Т.45, Вып.6. С.990-1006.

ROLE OF ASPARTATE AND GLUTAMATE RESIDUES IN OLIGOPEPTIDE HELIX STRURE ORGANISATION

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

(Russia, Pushchino)

Based on semi-empirical quantum-chemical and molecular dynamic calculation we discuss the important role of aspartic and glutamic acids in start process of helix formation of oligopeptide chain. It is shown: how with formation of the first turn of helix can be organized regular α -spiral form of various amino acid sequences. Some thermodynamic characteristics of the intermediates of such process are analyzed.