

Отчет о проделанной работе с использованием оборудования ИВЦ НГУ

1. Аннотация

В работе проводилась оптимизация геометрии структур димеров и мономеров полиглицина с помощью метода DFT B3LYP/6-31G(d). Эта диссоциация димеров, протекающую через разрыв межцепочечных водородных связей, рассматривается как процесс, моделирующий разворачивание вторичной структуры белков. С помощью DFT рассчитано изменение энергии межцепочечных водородных связей $N - H \cdots O = C$, обеспечиваемое изотопным замещением. Увеличение энергии Н-связи спадает в ряду пар изотопов: $H/D \gg {}^{14}N/{}^{15}N > {}^{16}O > {}^{18}O > {}^{12}C/{}^{13}C$. Кинетический изотопный эффект для замещения Н/D, равный отношению констант скорости $\frac{k(H)}{k(D)}$, был рассчитан в рамках теории переходного состояния с использованием модели «абсолютно рыхлого» переходного состояния. Установлено, что рассчитанные значения КИЭ и усиление межцепочечных водородных связей, обеспечиваемое изотопным замещением, существенно меньше, чем для ковалентных связей. Но суммарный эффект большого количества Н-связей, разрывающихся в процессе разворачивания белковых молекул, обеспечивает значения КИЭ, которые могут превышать характерные для ковалентной связи. Полученные результаты показывают также, что замещение тяжелых изотопов в межцепочечных Н-связях и внешних Н-связях, расположенных на периферии белков, могут обеспечивать сопоставимые эффекты стабилизации вторичной структуры.

2. Тема работы

Расчет кинетического изотопного эффекта при диссоциации димеров полиглицина как модельной системы для денатурации белков

3. Состав коллектива

1. Яншин Алексей Олегович, Новосибирский государственный университет, Институт химической кинетики и горения им В. В. Воеводского СО РАН
2. Киселев Виталий Георгиевич, к.ф.-м.н., с.н.с., Институт химической кинетики и горения им В. В. Воеводского СО РАН
3. Бакланов Алексей Васильевич, д.х.н., в.н.с, Институт химической кинетики и горения им В. В. Воеводского СО РАН

4. Информация о гранте

РНФ №23-23-00275 «Природа компенсационного эффекта в кинетике денатурации белков» (2023-2024 годы), руководитель – Бакланов Алексей Васильевич

5. Научное содержание работы

5.1 Постановка задачи

Температура является наиболее широко распространенным фактором денатурации белков. Поэтому агенты, обеспечивающие их термостабилизацию, представляют большой интерес для фундаментальных исследований и приложений. Одной из таких возможностей обеспечить термостабильность является изотопное замещение атомов, участвующих в водородных связях белков. Целью работы является оценка КИЭ в модели анфолдинга вторичной структуры белка – диссоциации димера β -листа полиглицина. Для ее достижения решались следующие задачи: 1) рассчитывалось изменение в энергии водородной связи за счет изотопного замещения Н/D, ${}^{14}N/{}^{15}N$, ${}^{16}O/{}^{18}O$ и ${}^{12}C/{}^{13}C$, 2)

исследовалось влияние длины димерных цепочек полиглицина, включающих моноизотопное замещение в водородных связях, на константу скорости диссоциации и КИЭ.

5.2 Современное состояние проблемы

Использование тяжелой воды D_2O в качестве агента, замедляющего биологические процессы, известно давно, большой массив данных, накопленный в этой области, недавно был рассмотрен в монографии [1]. Большое число работ, посвященных термостабильности белковых структур в H_2O и D_2O мотивировано использованием тяжелой воды в качестве способа замедления термической инактивации белков и ферментов, что особенно важно для фармацевтической промышленности [1]. Эту термостабилизацию связывают с кинетическим изотопным эффектом (КИЭ), возникающим в процессе тепловой денатурации и протекающей по механизму диссоциации слабых межцепочечных водородных связей. Этот результат согласуется с важной ролью водородных связей в определении структуры свернутых состояний белков [1]. Известно, что помимо специфики задач, связанных с термостабилизацией белков, использование тяжелой воды как растворителя может существенно повышать термостабильность белковых комплексов [1-2], защищать клетки [1-2] и простые многоклеточные организмы от теплового повреждения [1-2], предотвращая термическую денатурацию белков. Эффект замены легкой воды H_2O на D_2O также важен для проблем, связанных со здоровьем. Этот эффект включает повышение термостабильности различных вакцин, в том числе вакцины против полиомиелита, вируса гриппа А и В, против кори и еще ряда важнейших вакцин, представленных в недавней монографии Чена [1]. Одним из рассматриваемых механизмов этого эффекта D_2O является термостабилизация за счет КИЭ при денатурации белков вирусного капсида [1]. Стабилизация структуры белка в D_2O может привести к весьма существенному изменению биологической функциональности. Так, например, было установлено, что D_2O существенно повышает теплолюбивость и теплоустойчивость мух *Drosophila melanogaster* [2] вследствие кинетического изотопного эффекта.

Биологические системы различают изотопы не только в паре водород/дейтерий, но и для других биогенных элементов [3]. Это подтверждается снижением содержания тяжелых изотопов с течением времени в клетках различных организмов и сопровождается снижением их жизнеспособности, замедлением роста и деления клеток [3]. В частности, выдвинута гипотеза [3], что добавление тяжелых изотопов биогенных элементов в организм может увеличивать время их жизни, в том числе и человека. В подтверждение гипотезы авторами [3] было обнаружено существенное увеличение времени жизни дрожжей при использовании в качестве компонента питательной среды тяжелой воды вместо H_2O . В качестве причины такого влияния изотопного замещения авторы рассматривают кинетический изотопный эффект (КИЭ).

Предполагается, что основной причиной уменьшения скорости химических реакций при замещении атомов на их тяжелые изотопы является упрочнение химических связей. Существуют оценки такого упрочнения для ковалентных химических связей, однако для водородных связей белков такие данные отсутствуют. Также отсутствуют и оценки кинетического изотопного эффекта для процессов термической денатурации белков.

1. Chen C. H. Deuterium Oxide and Deuteration in Biosciences. – Springer Nature, 2022.
2. Александров В.Я. О стабилизирующем действии тяжелой воды (D_2O) на клетку // Цитология. – Т.28. – 1986. – С.779-789
3. Li X., Snyder M. P. Can heavy isotopes increase lifespan? Studies of relative abundance in various organisms reveal chemical perspectives on aging //BioEssays. – 2016. – Т. 38. – №. 11. – С. 1093-1101.

5.3 Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы

Мы моделируем процесс, при котором происходит развертывание вторичной структуры белков, мономолекулярной реакцией диссоциации димера в газовой фазе на две одиночные мономерные молекулы полиглицина:



Для расчетов $k_{unfolding}$ – константы скорости разворачивания (unfolding) вторичной структуры димера полиглицина мы использовали теорию переходного состояния. На рис. 1 показана химическая структура β -листа димера полиглицина образованного полипептидными мономерными цепочками.

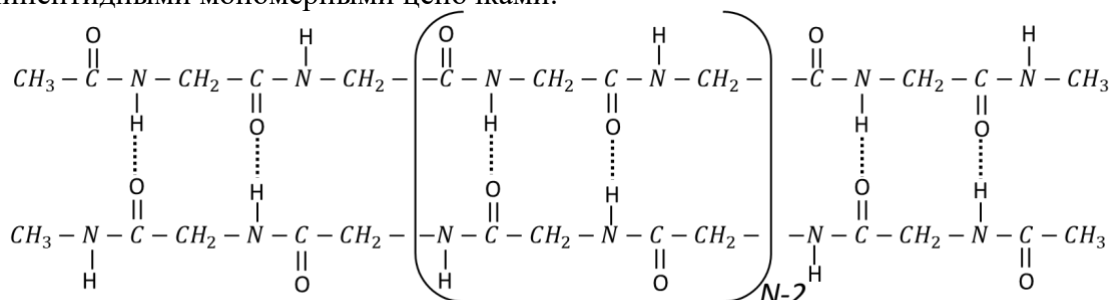


Рис. 1. Химическая структура димера полиглицина, содержащего 3 звена. Черные пунктирные линии обозначают межцепочечные водородные связи.

Процесс диссоциации димерных структур протекает как разрыв этих межцепочечных водородных связей с образованием двух мономерных цепочек. Данная система варьируемой длины, моделирующая распад вторичной структуры белка, позволяет нам произвести оценку кинетического изотопного эффекта, обеспечиваемого изотопным замещением в межцепочечных и внутрицепочечных водородных связях мономеров и димеров. Мы вычисляем энтальпию реакции процесса диссоциации при нулевой температуре (0 K) с помощью стандартного выражения:

$$E_0 = \Delta H_0^0 = \sum_{\text{продукты}} H_{\text{прод}}^0(0\text{ K}) - \sum_{\text{реагенты}} H_{\text{реак}}^0(0\text{ K}), \quad (2)$$

где $H_{\text{прод/реак}}^0(0\text{ K}) = E_{\text{elec}} + E_{\text{ZPE}}$, где E_{elec} – электронная энергия, E_{ZPE} – энергия нулевых колебаний молекулы ($ZPE = \frac{1}{2} \sum h\nu_i^{\text{прод/реак}}$). В свою очередь, термодинамические потенциалы в газовой фазе, используемые в работе для исследования стационарных геометрий молекул димеров и мономеров полиглицина, рассчитывались согласно стандартным формулам из статистической физики. Для этого из DFT расчетов извлекались электронные энергии соединений, энергии нулевых колебаний и моменты инерции молекул.

Для расчета статсуммы переходного состояния Q^\ddagger применяется подход «абсолютно рыхлого» переходного состояния (АРПС), описанный в работе [1]. Уравнение для константы скорости диссоциации димеров полиглицина в газовой фазе в рамках теории переходного состояния можно переписать следующим образом:

$$k_{TST} = \frac{\kappa T}{h} \cdot \frac{Q_{\text{кд}} \cdot Q_{\text{rot,мон}}^2 \cdot Q_{\text{vibr,мон}}^2}{Q_{\text{rot,дим}} \cdot Q_{\text{vibr,дим}}} \cdot e^{-\frac{\Delta H_0^0}{\kappa T}}, \quad (3)$$

где $Q_{\text{кд}} = \frac{2 \cdot \mu \cdot (R^\ddagger)^2 \cdot \kappa T}{\hbar^2}$ – вращательная статистическая сумма квазидвухатомных частиц, образованных из двух точечных масс мономерных звеньев, расположенных на расстоянии R^\ddagger , Q_{tr} , Q_{rot} , Q_{vibr} – поступательная, вращательная и колебательная статсуммы соответственно.

Геометрии всех структур, соответствующих стационарным точкам на ППЭ изучаемых соединений, были полностью оптимизированы методом DFT/B3LYP/6-31G(d) [2]. После получения стационарных геометрий исследуемых соединений, мы производили расчет частот нормальных колебаний исследуемых молекул газофазных димеров и мономеров полиглицина и проверяли, что они действительно отвечают локальным

минимумам на адиабатической ППЭ (то есть, что матрица Гессе электронной энергии положительно определена). Численное интегрирование обменно-корреляционных членов функционалов плотности проводилось на сверхмелких сетках (superfine grid).

1. Baklanov A. V., Kiselev V. G. The Nature of the Enthalpy–Entropy Compensation and “Exotic” Arrhenius Parameters in the Denaturation Kinetics of Proteins //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 13. – С. 10630.

2. Cramer C. J. Essentials of computational chemistry: theories and models. – John Wiley & Sons, 2013.

5.4 Полученные результаты

Оптимизированные с помощью теории функционала плотности структуры типичных димерных и мономерных звеньев полиглицина показаны на рисунке 2. Расчеты проводились со структурами димеров и мономеров, содержащих 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 13, 14 и 16 звеньев. Геометрия мономера с симметрией C_s соответствует плоской транс-транс (all-trans) конформации. Данная структура соответствует взаимному расположению мономерных цепочек полиглицина в кристалле полиглицина I и определяется в работе [1] как антипараллельный гофрированный лист (antiparallel chain-rippled sheet structure). Все геометрии димерных звеньев принадлежат точечной группе C_i .

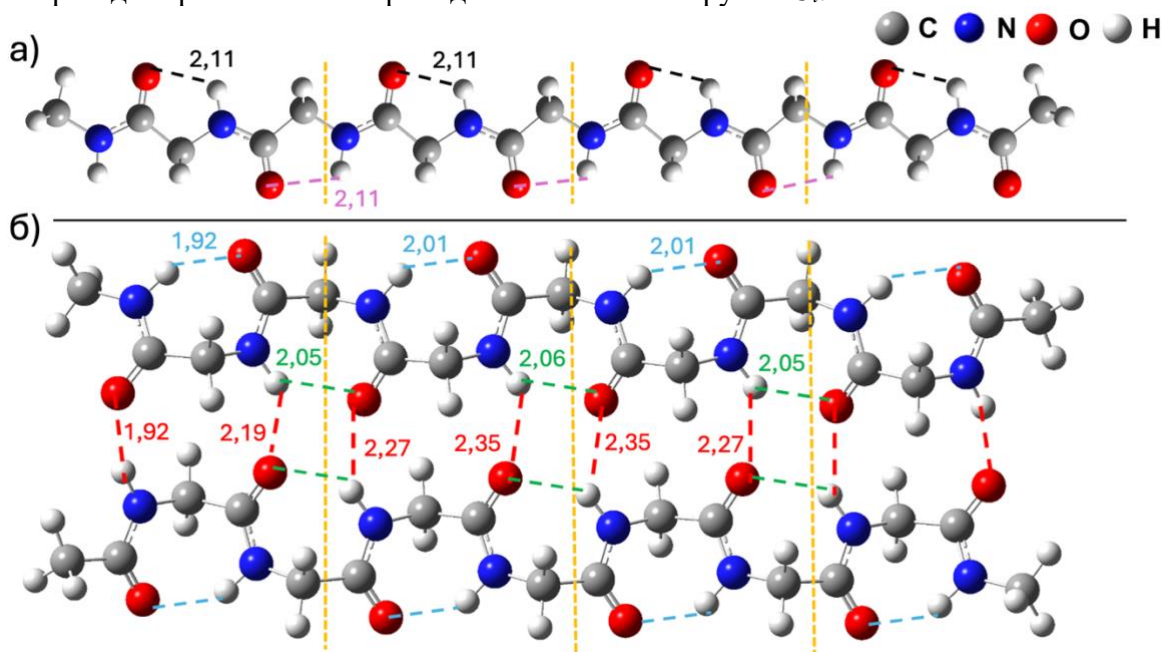


Рис.2. Оптимизированные (энергетически минимизированные) структуры а) мономеров 4 звеньев и б) димеров 4 звеньев в газовой фазе. Красные пунктирные линии соответствуют межцепочным водородным связям. Желтой пунктирной линией отделены друг от друга димерные звенья. Значения длин меж- и внутримолекулярных связей (в Å) отмечены соответствующим цветом.

Межцепочечные водородные связи придают жесткость структуре димера. Эффект замещения тяжелых изотопов изучали при двух вариантах замещения: 1) - замена производилась в каждой из $2N$ межцепочечных водородных связей димера (первичный КИЭ), 2) - замена производилась также в водородных связях, расположенных на периферии полипептидных цепочек (вторичный КИЭ).

Диссоциация димеров протекает посредством разрыва межцепочечных водородных связей $N - H \cdots O = C$ между полипептидными цепочками и перестройки внутрицепочечных Н-связей. Укрепление водородных связей, обеспечиваемое тяжёлым

изотопным замещением ($\delta_{light}^{heavy}(E_{H-bond})$), происходит из-за изменения энергии нулевых колебаний $\delta(ZPE)$.

С использованием теории функционала плотности (DFT/B3LYP/6-31G(d)) рассчитано изменение энергии межцепочечных водородных связей $N-H \cdots O=C$ при изотопном замещении (H/D, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ и $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$). Показано, что максимальное расчетное усиление межмолекулярной H-связи обеспечивается H/D замещением со значением $\delta_H^D(E_{H-bond}) \approx 0,05$ ккал/моль и этот эффект влияния изотопного замещения спадает в ряду пар изотопов: H/D \gg $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ $>$ $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ $>$ $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ (рис.3).

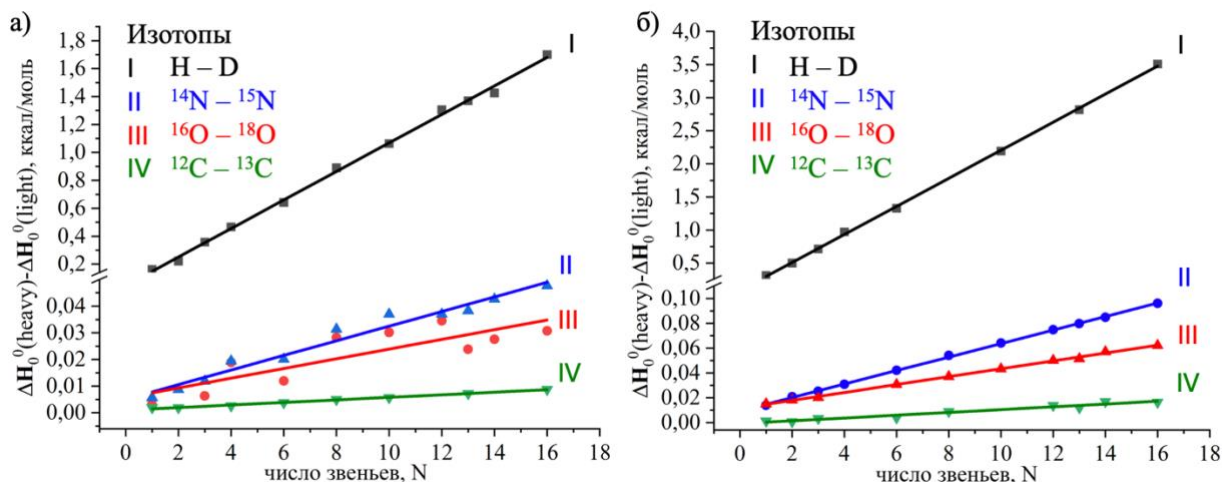


Рис. 3. Линейная аппроксимация изменения энтальпии реакции диссоциации (I) ΔH_0^0 , в зависимости от длины цепи димера: а) изотопное замещение в межмолекулярных водородных связях; б) изотопное замещение в межмолекулярных и внутримолекулярных водородных связях.

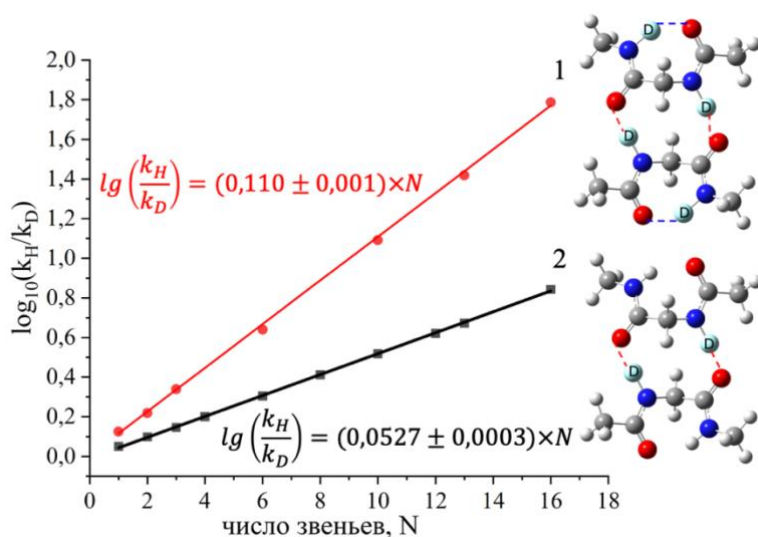


Рис. 4. Кинетический изотопный эффект (КИЭ), обеспечиваемый изотопным замещением H/D: 1) красная прямая соответствует изотопному замещению во всех водородных связях, в зависимости от длины цепи димера; 2) черная прямая соответствует изотопному замещению только в межцепочечных водородных связях. Линии соответствуют аппроксимации методом наименьших квадратов. Точки отсечения на оси ординат для обеих прямых равны 0 в пределах полученной погрешности.

С использованием модели «абсолютно рыхлого» переходного состояния рассчитаны значения КИЭ для развертывания димерной цепочки полиглицина при изотопном Н/Д замещении (рис.4). Показано, что, хотя КИЭ для разрыва одной водородной связи существенно меньше значений, характерных для разрыва ковалентной С-Н связи, но при длине разворачиваемой цепочки в несколько десятков аминокислотных остатков величина первичного изотопного эффекта достигает высоких значений и в рамках данной работы со структурой, содержащей 32 аминокислотных остатка, составляет около $\frac{k(H)}{k(D)} \approx 7$.

Показано, что при изотопном Н/Д замещении во всех водородных связях, включая периферийные, что соответствует условиям экспериментов с использованием D₂O в качестве растворителя, КИЭ для димера полиглицина длиной 32 аминокислотных остатка достигает значений около $\frac{k(H)}{k(D)} \approx 60$, что указывает на сопоставимые значения первичного и вторичного кинетического изотопного эффектов при разворачивании димеров полипептида. Этот результат означает, что существенная стабилизация структуры белка может происходить и за счет изотопного замещения в Н-связях, расположенных на периферии белка.

1. Moore W. H., Krimm S. Vibrational analysis of peptides, polypeptides, and proteins. I. Polyglycine I //Biopolymers: Original Research on Biomolecules. – 1976. – Т. 15. – №. 12. – С. 2439-2464.

6. Эффект от использования кластера в достижении целей работы

Теория функционала плотности очень эффективна и является важным инструментом для изучения различных фрагментов биологических систем. Биополимеры целиком слишком сложны для квантовохимических расчетов из-за их большого размера. Для квантовохимических расчетов в рамках моделирования анфолдинга вторичной структуры белка, системы, содержащей сотни атомов, было использовано оборудование ИВЦ НГУ. Использование ресурсов суперкомпьютера является в данном случае незаменимым условием, поскольку предоставляет уникальную возможность проводить квантовохимические вычисления сложных биологических фрагментов.