

Тема работы

Структура димеров глицирризиновой кислоты в водном растворе

Состав коллектива

Ким Александра Валерьевна
Зеликман Максим Валентинович
Аникеенко Алексей Владимирович
Кадцын Евгений Дмитриевич
Медведев Николай Николаевич
Селютина Ольга Юрьевна
Поляков Николай Эдуардович

Научное содержание работы:

Глицирризиновая кислота (ГК) является экстрактом корня солодки и обладает широким спектром биологической активности [1]. Она представляет собой амфифильную молекулу с гидрофильным сахарным хвостом и гидрофобным остовом (см. Рис.1).

Глицирризиновую кислоту рассматривают, в частности, как молекулу, потенциально

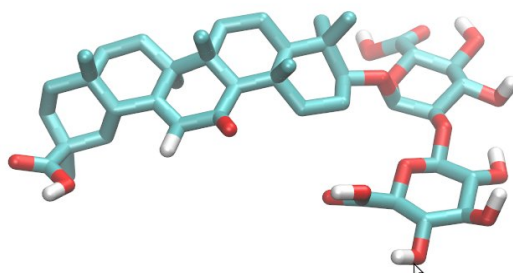


Рис.1. Молекула глицирризиновой кислоты

применимую для транспортировки малорастворимых в воде лекарственных молекул, образуя с ними комплексы включения [2]. Предполагалось, что молекулы ГК могут образовывать комплекс с полостью внутри, доступную для молекулы-гостя.

Постановка задачи

Исследовать структуру димеров глицирризиновой кислоты в водном растворе при помощи молекулярно-динамического моделирования.

Современное состояние проблемы

Экспериментально известно, что глицирризиновая кислота образует стабильные ассоциаты со многими органическими молекулами [3, 4], а также проявляет мицеллообразующие свойства [5]. Однако механизмы этих процессов, равно как и структуры ассоциатов остаются неизвестными. Есть свидетельства, что комплексы ГК:молекула-гость образуются в соотношении 2:1 [6]. В связи с этим, представляет интерес изучение, в первую очередь, димеров ГК. Методом, позволяющим выявить структурные особенности взаимного расположения молекул в самоассоциате, является компьютерное моделирование.

Из немногочисленных работ по моделированию глицирризиновой кислоты можно выделить работу [7], в которой проводится исследование самоассоциации молекул ГК с использованием квантовохимических расчетов. В вакууме бимолекулярные комплексы ГК организуются ряд устойчивых структур, из которых наиболее энергетически выгодной оказывается структура типа "голова-хвост". Авторы отмечают наличие внутренней полости в данной структуре, пригодной для включения соразмерных молекул-гостей.

Полость стабилизирована водородными связями между молекулами ГК. Для оценки влияния растворителя авторы добавляют шесть молекул воды, которые встраиваются внутрь полости. Однако отметим, что в реальных системах молекулы ГК окружены растворителем со всех сторон, и поскольку молекула ГК частично гидрофобна, то влияние воды на структуру бимолекулярного ассоциата может оказаться намного большим, чем взаимодействие между молекулами ГК. В связи с этим разумно предположить, что для оценки влияния растворителя необходимо добавлять не несколько молекул воды, а намного больше (100-1000), что не представляется возможным сделать в рамках квантово-химического моделирования. В работе также представлены расчеты гексамолекулярных кластеров ГК, организованных в шестичленные кольца, в которых также имеется внутренняя полость. И приводится оценка встречаемости разных комплексов в вакууме на основе масс-спектрометрического метода.

Также имеется исследование [8], в котором проводится моделирование глицирризиновой кислоты как ингибитора Ку-белка, отвечающего за репарацию ДНК и потенциально применимого в качестве антиопухолевого агента. Результаты докинга показывают, что глицирризин, а также македонозид С лучше всего (из целого банка данных веществ традиционной китайской медицины) подходят для реакционного центра данного белка. Для получения информации о динамике взаимодействия белок-лиганд проводится молекулярно-динамическое моделирование комплекса в течение 10 нс в NVE-ансамбле, в ходе которого комплекс не распадается, а наоборот, стабилизируется. Следует отметить, что производится моделирование отрицательно заряженных лигандов (-3e).

Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы

В данной работе мы моделируем димеры ГК, растворённые в воде. Проводим анализ взаимного расположения молекул ГК, исследуем наличие характерных типов димеров ГК, а также влияние выбранной модели воды и параметризации ГК.

Молекулярно-динамическое моделирование проводилось в пакете программ GROMACS [9]. Модель раствора должна содержать 2 молекулы глицирризиновой кислоты и ~7000 молекул воды в NPT-ансамбле при нормальных условиях (1 bar, 300 K). Ввиду того, что в литературе нет готовой молекулярно-динамической топологии ГК, нами была проведена параметризация этой молекулы двумя способами. Для начала был использован стандартный, рекомендуемый разработчиками Gromacs, инструмент ATB (Automatic topology builder) [10], позволяющий генерировать файл топологии молекулы, используя в качестве основы поле сил GROMOS, параметры которого корректируются в процессе многостадийной оптимизации, включающей квантово-механическое моделирование (полуэмпирический метод PM3). В ходе параметризации рассчитывается оптимальное взаимное положение атомов, а также пространственное распределение электронной плотности. Затем производится процедура расстановки зарядов в центры атомов с целью воспроизведения полученного распределения зарядов вблизи поверхности молекулы. В качестве стартовой конфигурации для ATB использован файл с координатами молекулы ГК из базы данных ATB [11]. Для воды была взята модель Tip4p-Ew.

Кроме того, была проведена параметризация молекулы глицирризиновой кислоты в пакете Amber [12] с помощью пакета Gaussian [13]. Для этого использовалась с та же стартовая конфигурация, что и для ATB. Отличие составляет более точный расчёт распределения электронной плотности и процедура расставления зарядов на центры атомов, которая включает в рассмотрение симметрию некоторых частей молекулы. Для воды в этом случае была использована модель Tip3p как стандартная для поля сил Amber. Также было проведено моделирование с совершенно другой моделью воды, Tip4p/2005, которая на данный момент наиболее адекватно воспроизводит основные особенности воды в нормальных условиях. Используемые модели растворителя и поля сил схематично изображены в следующей Табл.1:

Табл.1. Используемые в работе модели глицирризина и воды

| Вода □ | Модель глицирризина: | |
|------------|----------------------|-------|
| | ATBuilder | Amber |
| Tip4p-Ew | ✓ | |
| Tip3p | | ✓ |
| Tip4p/2005 | | ✓ |

Для всех трёх случаев было проведено молекулярно-динамическое моделирование в пакете Gromacs 4.5.3 на кластере ИВЦ НГУ [14]. Суммарное время основного моделирования (production run) составило около 11 μ s. Использовался шаг интегрирования 2 фс. Сбор данных производился после достаточно продолжительной релаксации последовательно в NVT и NPT-ансамблях. Для основного моделирования мы использовали термостат Нозе-Хувера [15] со временем релаксации 0,5 пс в комбинации с баростатом Парринелло-Рамана [16] со временем релаксации 1 пс. Электростатическое взаимодействие рассчитывалось при помощи быстрого метода суммирования Эвальда [17] с интерполяцией четвёртого порядка, интервалом решётки 0,12 нм и радиусом обрезания в реальном пространстве 1,2 нм с применением дальнедействующей аналитической коррекции потенциала и давления. Ван дер Ваальсовское взаимодействие, равно как и список соседей Верле, обрезались на расстоянии 1,2 нм. Для дальнейшей обработки сохранялись конфигурации каждые 2 пс, энергии – каждую 1 пс.

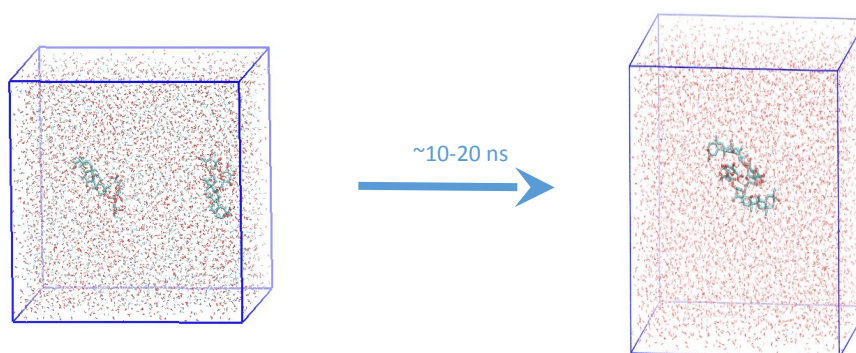


Рис.2. Образование димера ГК в водном растворе

Для получения более статистически- достоверного ансамбля конфигураций, было проведено около 40 запусков моделирования, в каждом из которых молекулы глицирризиновой кислоты помещались с воду как можно дальше друг от друга в периодическом модельном боксе размером около 6 нм, Рис.2. Затем молекулы ГК свободно диффундировали в воде, пока, встретившись, не образовывали димер. На это требовалось примерно от 10 до 20 нс. После момента слипания молекулы больше не расходились в течение всего времени моделирования (в некоторых случаях оно достигало 1 мкс), что согласуется с тем, что молекула ГК, в целом, гидрофобна.

С момента образования димера начинался сбор статистики с целью выявления наличия характерных взаимных ориентаций структурных особенностей. Было выяснено, что структуру димеров достаточно подробно можно охарактеризовать взаимной ориентацией гидрофильных и гидрофобных частей молекул ГК. Для этого гидрофобной части сопоставлялся вектор А, гидрофильной – вектор В, Рис.3. Двум молекулам димера соответствовали вектора А, В, А', В', между ними попарно вычислялся косинус. Кроме того, рассчитывалось расстояние между центрами молекул.

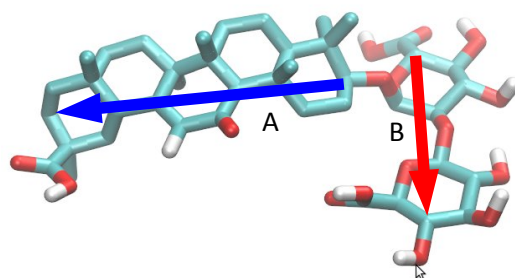


Рис.3. Вектора A и B, описывающие направления гидрофобного и гидрофильного хвоста молекулы ГК соответственно

Для обработки данных использовались инструменты пакета Gromacs, а также shell-scripting и другие средства.

Полученные результаты

При растворении в водной среде молекулы ГК показывают тенденцию к слипанию, при этом образуют устойчивые ассоциаты, характеризующиеся набором типичных структур. Несмотря на то, что димеры не распадаются в течение всего времени моделирования, они представляют собой довольно подвижные структуры. Время от времени молекулы перемещаются относительно друг друга, обходят друг друга и поворачиваются. Оказалось, что из всего разнообразия взаимных ориентаций реализуется лишь ограниченный набор типов димеров. Типы димеров хорошо локализируются на двумерной диаграмме, по оси абсцисс которой отложены косинусы углов между гидрофобными остовами AA', по оси ординат – между гидрофильными хвостами BB', Рис.4.

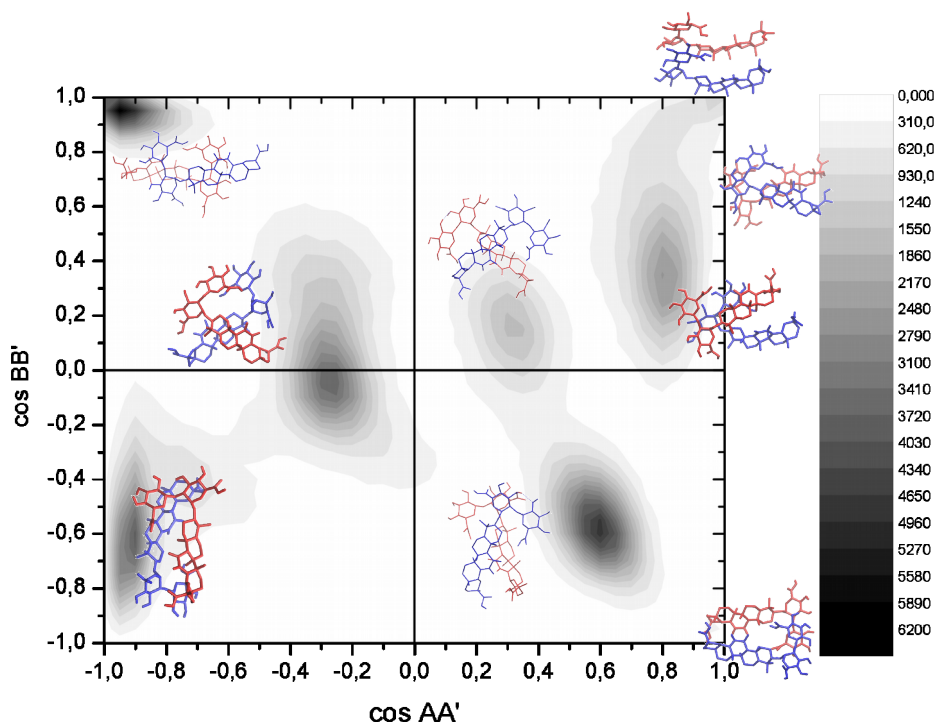


Рис.4. Диаграмма типов димеров ГК с параметризацией АТВ, водой Тір4р-Еw. Суммарная статистика - 8 мкс. По оси абсцисс отложены косинусы углов между гидрофобными остовами AA', по оси ординат – между гидрофильными хвостами BB'

На Рис.4 затемнённые области соответствуют характерным типам димеров ГК в воде. Также там показаны изображения непосредственно молекул ГК, образующих димер данного типа. Населённость типов в процентном соотношении представлена на

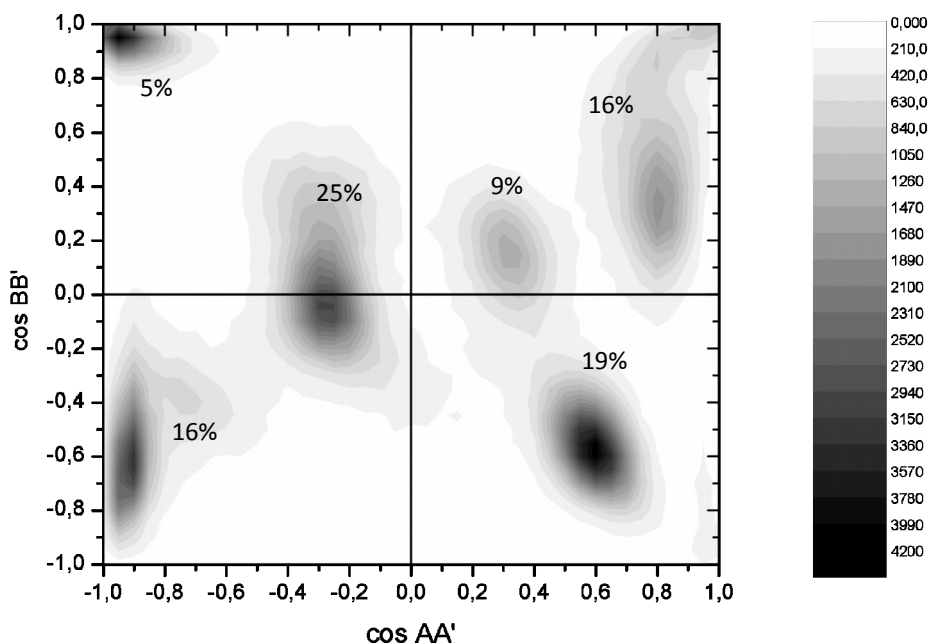


Рис.5. Населённость пиков для типов димеров ГК с параметризацией ATB, водой Tpr4p-Ew.

Аналогичный анализ был проведён для другой параметризации ГК, в поле сил Amber с водой Tpr3p, Рис.6.

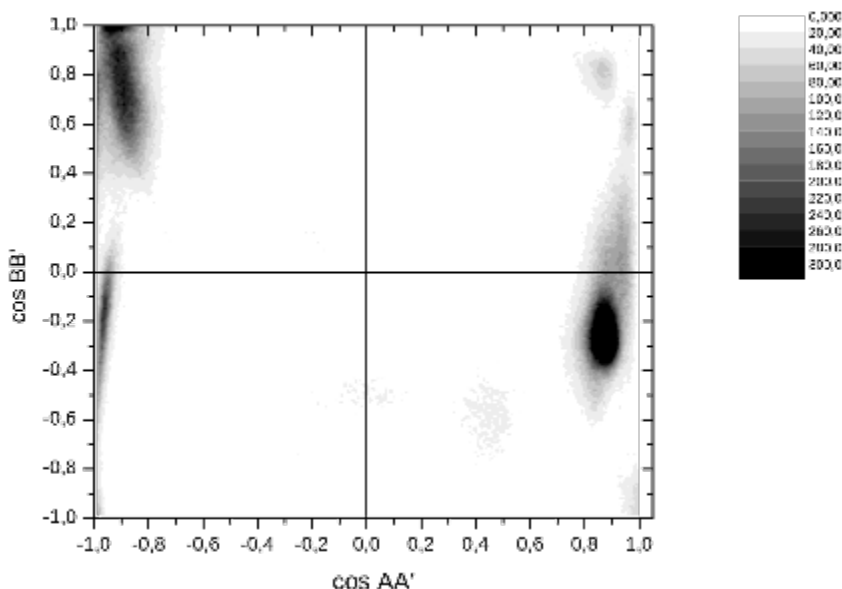


Рис.6. Диаграмма типов димеров ГК с параметризацией Amber, водой Tpr3p. Суммарная статистика - 1,4 мкс.

Видим, что здесь тоже получается несколько типов димеров, однако картина несколько отличается.

На Рис.7 представлена диаграмма типов димеров ГК с параметризацией Amber, водой Тір3р. Суммарная статистика - 1,4 мкс.

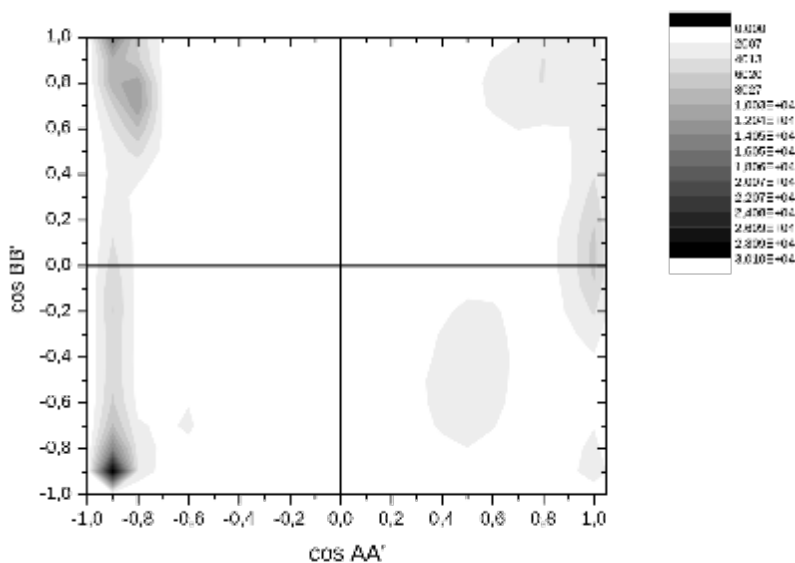


Рис.7. Диаграмма типов димеров ГК с параметризацией Amber, водой Тір4р/2005. Суммарная статистика - 1,4 мкс.

Из Рис.6 и Рис.7 видно, что в целом они схожи, однако наблюдаются существенные отличия в относительной населённости разных типов димеров. Отсюда следует, что модель воды играет также немаловажную роль. В случае с параметризацией ГК в поле сил Amber и моделью воды Тір4р/2005 наблюдается одно самое характерное расположение молекул ГК друг относительно друга – антипараллельное направление и гидрофобной, и гидрофильной частей молекул ГК, так называемый тип димера «голова к хвосту».

Также было проанализировано количество водородных связей, образующихся с молекулами ГК, Рис.8. Видно, что для параметризации АТВ некоторые типы димеров определяются изменением внутренней геометрии одной из молекул или обеих сразу. Некоторые типы димеров имеют взаимную ориентацию, в которой выгодно образование водородных связей между молекулами ГК в димере. Вероятно, эти водородные связи способствуют стабильности таких комплексов.

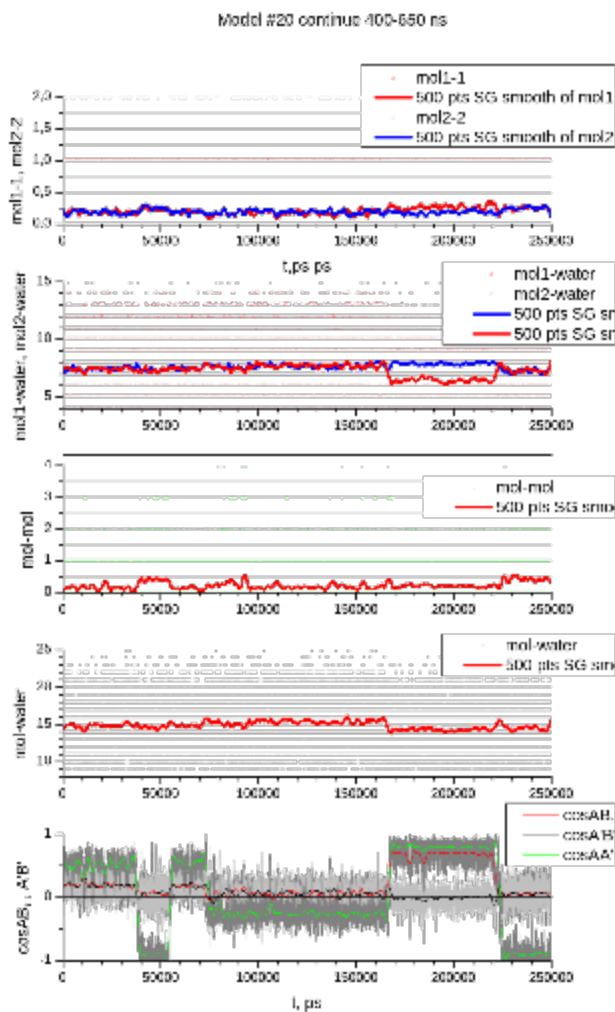


Рис.8. Количество водородных связей в зависимости от времени для одного из запусков в модели ГК с параметризацией ATB. Сверху – количество водородных связей, которые каждая из двух молекул ГК образует сама с собой, ниже – каждая из молекул с окружающей водой, далее – количество водородных связей между двумя молекулами ГК, второй снизу график – суммарное количество водородных связей димер-вода, нижний график – внутренняя геометрия молекулы: зависимость косинуса AB от времени для обеих молекул.

В дальнейшем планируется провести моделирование глицирризиновой кислоты вблизи поверхности мембраны с целью выявления механизмов взаимодействия и встраивания в липидный би-слой.

Иллюстрации, визуализация результатов

Для визуализации результатов используется программа VMD [18]. Для обработки данных и построения графиков – OriginLab.

Эффект от использования кластера в достижении целей работы

Перечень публикаций, содержащих результаты работы (если есть). Указать импакт-фактор журнала (Thomson Reuters, РИНЦ,...)

Основные расчёты в данной работе были проделаны на кластере ИВЦ НГУ.

Публикация по данной работе ещё не вышла. Частично результаты вошли в статью [19].

Ваши впечатления от работы вычислительной системы и деятельности ИВЦ НГУ, а также Ваши предложения по их совершенствованию

Вычислительная система работает отлаженно и надёжно. Непредвиденные сбои оперативно устраняются. В целом впечатление исключительно положительное.

Литература

1. Г. А. Толстикова, Л. А. Болтина, Р. М. Кондратенко [и др.]. Солодка: биоразнообразие, химия и применение в медицине. Новосибирск : НП Академическое изд-во «Гео», 2007.
2. Tolstikova T.G., Khvostov M.V., Bryzgalov A.O. The Complexes of Drugs with Carbohydrate-Containing Plant Metabolites as Pharmacologically Promising Agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2009. – 9.
3. Vavilin V.A., Salakhutdinov N.F., Ragino Yu.I., Polyakov N.E., Taraban M.B., Leshina T.V., Stakhneev E.M., Lyakhovich V.V., Nikitin Yu.P., Tolstiko G.A. // *Biomed. Chem.* – 2008. – 54. – P. 301 – 313
4. Polyakov N.E., Magyar A., Kispert L.D. // *J. Phys. Chem. B.* – 2013. – 117, N 35. – P. 10173 – 10182
5. Kornievskaya V.S., Kruppa A.I., Polyakov N.E., Leshina T.V. // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* – 2007. – 60. – P. 123 – 130
6. Polyakov N.E., Leshina T.V., Salakhutdinov N.F. et al. // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – 110. – P. 6991 – 6998
7. Процессы самоассоциации молекул глицирризиновой кислоты: масс-спектральное и квантово-химическое исследование / А.В. Лекарь, А.А. Милов, С.Н. Борисенко [и др.] // *Вестник Южного научного центра РАН.* – 2012. – Т. 8, No 2. – С. 18–26.
8. Chang, T.-T., Sun, M.-F., Chen K.-C. et.al. Drug discovery of DNA break repair system by screening from TCM database and molecular dynamics approach. *Molecular Simulation*, 37, 9, 804-811, 2011.
9. Van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E., and Berendsen, H.J.C. (2005) GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16):1701–1718.
10. Malde AK, Zuo L, Breeze M, Stroet M, Poger D, Nair PC, Oostenbrink C, Mark AE: An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. *J Chem Theory Comput* 2011, 7(12):4026-4037.
11. <http://compbio.biosci.uq.edu.au/atb/molecule.py?molid=5447>
12. D.A. Case, V. Babin, J.T. Berryman, R.M. Betz, Q. Cai, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, H. Gohlke, A.W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M. Merz, F. Paesani, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C.L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu and P.A. Kollman (2014), AMBER 14, University of California, San Francisco.
13. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels,

- M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Peng, A. Namayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople. Gaussian 03, E.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004
14. <http://www.nusc.ru/>
 15. W. G. Hoover, Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions, *Phys. Rev. A.* 31 (1985) 1695–1697.
 16. M. Parrinello, A. Rahman, Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method, *J. Appl. Phys.* 52 (1981) 7182–7180.
 17. U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T.A. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Phys.* 103 (1995) 8577–8593.
 18. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>
 19. Зеликман М.В., Ким А.В., Медведев Н.Н., Селютина О.Ю., Поляков Н.Э. Структура димеров глициризиновой кислоты и их комплексов с холестерином. Молекулярно-динамическое моделирование. *Журнал структурной химии*, 56, 1, с. 73-82, 2015