



ОСОБЕННОСТИ КОМПЛЕКСОВ САМООРГАНИЗУЮЩИХСЯ ПЕПТИДОВ H-(RADA)₄-OH СО СЛОЯМИ В *syn*- И *anti*-ОРИЕНТАЦИИ¹

© 2023 г. А. В. Данилкович*, #, Д. А. Тихонов**, ***, В. М. Липкин*

*Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

**Институт математических проблем биологии РАН – филиал Института прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН, Россия, 142290 Пущино, ул. проф. Виткевича, 1

***Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Россия, 142290 Пущино, ул. Институтская, 3

Поступила в редакцию 28.11.2022 г.

После доработки 23.12.2022 г.

Принята к публикации 24.12.2022 г.

Молекулы пептида H-(RADA)₄-OH в водно-солевых растворах способны образовывать двуслойные фибриллы в виде биотропного материала, который пригоден в качестве подложки для роста и дифференцировки клеток позвоночных. В филаменте два β-слоя взаимодействуют гидрофобными поверхностями, сформированными метильными группами остатков аланина. Заряженные группы остатков аргинина и аспарагиновой кислоты экспонированы вовне, при этом пептиды, составляющие филамент, находятся в β-конформации. Методом молекулярной динамики изучали изменения во времени геометрии комплексов 24 пептидов H-(RADA)₄-OH при 80 и 300 К. Определено, что комплекс антипараллельных пептидов наиболее стабилен, характеризуется наименьшими величинами свободной энергии и среднеквадратичного отклонения координат атомов (RMS) при 80 и 300 К. Впервые охарактеризована модель стабильной структуры комплекса 24 параллельных пептидов, состоящего из двух β-слоев в *syn*-ориентации. Наличие нескольких стабильных комплексов пептидов, имеющих разную компоновку молекул H-(RADA)₄-OH в составе протофиламента, подчеркивает важность изучения способов самоорганизации пептидов в растворе.

Ключевые слова: самоорганизация, матрикс, структура филамента, полярные пептиды, H-(RADA)₄-OH

DOI: 10.31857/S0132342323030107, **EDN:** PDPGKU

ВВЕДЕНИЕ

Самоорганизующиеся полярные пептиды представляют собой амфифильные структуры, нековалентно взаимодействующие друг с другом и образующие сложные надмолекулярные комплексы при физиологических условиях, при этом стабилизирующую роль играют как гидрофобные взаимодействия, так и водородные свя-

зи [1]. Учитывая растущий интерес к получению новых материалов для биомедицины, искусственный матрикс на основе самоорганизующихся пептидов рассматривается в качестве возможной основы для тканеспецифичной среды при формировании компонентов тканей и воссоздании трехмерных участков органов [2]. В этой связи пептид H-(RADA)₄-OH занимает особое место, выступая исторически первым примером синтетического соединения, способного формировать филаменты шириной ~5 нм и длиной в сотни нанометров, образуя биогель с высокой степенью обводненности (>98%) [3]. Материал, полученный на основе самоорганизующихся пептидов типа H-(RADA)₄-OH, обладает высокой стабильностью к температурным и механическим воздействиям, устойчив в широком диапазоне значений pH 2.0–10.0. Искусственный матрикс обладает биотропностью в отношении клеток эукариот разных типов, включая стволовые клетки [4]. Таким образом биогель, формируемый пептидами H-(RADA)₄-OH, может быть

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: H-(RADA)₄-OH – пептид RADARADA-RADARADA; DAN24 – комплекс 24 антипараллельных пептидов H-(RADA)₄-OH; DS24 – комплекс 24 параллельных пептидов, смещенных в вертикальной плоскости относительно друг друга, с β-слоями в *syn*-ориентации; DPN24 – комплекс 24 параллельных пептидов с β-слоями в *anti*-ориентации; DSS24 – комплекс 24 параллельных пептидов с β-слоями в *syn*-ориентации; NDSS24 – комплекс 24 параллельных пептидов, смещенных в двух плоскостях относительно друг друга, с β-слоями в *syn*-ориентации; RMS – среднеквадратичное отклонение координат атомов.

Автор для связи: (тел.: +7 (985) 360-02-92; эл почта: danilkovich@bibch.ru).

использован не только в медицине для регенерации тканей, но и в качестве “подложки” при культивировании линий клеток-продуцентов на биотехнологических производствах, используемых для наработки разнообразных веществ [5].

Смесь самоорганизующихся пептидов с химическими веществами, имеющими ограниченную растворимость в воде, позволяет получать биогель с функцией “хранилища” слаборастворимой субстанции, обеспечивая сравнительно низкую скорость диффузии в окружающую среду “инкорпорированного” вещества. Подобная система на основе биогеля может использоваться в качестве искусственного “депо” лекарственных средств применительно к комбинированной клеточной терапии болезней, предполагающей использование веществ с ограниченной растворимостью в водной среде [2, 6].

Пептид $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ — продукт химического синтеза, что подразумевает возможность модификации последовательности остатков аминокислот, в том числе дополнения молекулы пептида функциональными участками типа $-\text{RGD}$, $-\text{YIGSR}$ или $-\text{IKVAV}$, соответствующими элементам контактных структур белков внешней мембраны клетки и определяющими определенный тип клеточных взаимодействий [2]. Это позволяет формировать функциональные элементы на поверхности филаментов, получая искусственный матрикс с более выраженным родством к клеткам позвоночных, экспрессирующим на внешней мембране соответствующие рецепторы [5].

Участки белка с чередующимися заряженными и гидрофобными аминокислотными остатками были обнаружены у дрожжей более 30 лет назад [7]. Следует отметить, что несмотря на сравнительно долгую историю изучения полярных самоорганизующихся пептидов, тонкая организация филамента, сформированного пептидами $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$, на данный момент до конца не выяснена. Первичная структура пептида $\text{H}-(\text{RADARADARADARADA})\text{-OH}$ характеризуется чередующимися противоположно заряженными аминокислотными остатками, разделенными гидрофобными остатками аланина [8]. Эта особенность строения, а именно чередование гидрофильных и гидрофобных групп, определяет наряду с гидрофобными взаимодействиями возможность реализации межмолекулярных водородных связей и электростатических взаимодействий по типу ионных пар или так называемых “солевых мостиков”.

Амфифильный синтетический пептид $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ в составе комплекса находится в виде β -складчатой структуры, стабилизированной водородными связями между пептидными остовами соседних молекул по всей длине

филамента [9, 10]. В водном растворе молекулы пептида $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ существуют преимущественно в конформации α -спирали [11], но способны быстро агрегировать при добавлении соли, образуя стабильные комплексы в виде протяженных (до сотен нанометров) филаментов. В результате самоорганизации полярных пептидов типа $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ образуются водородные связи между пептидными остовами соседних молекул, находящимися в β -конформации [9]. Заряженные боковые заместители аминокислотных остатков R и D при этом экспонированы по одну сторону β -листа, а метильные группы остатков A — по другую [10]. В этом случае на одной стороне β -складки образуется обширная гидрофобная поверхность, сформированная метильными группами боковых заместителей остатков аланина, существование которой в полярном окружении затруднено. Поэтому в водном растворе гидрофобные поверхности двух β -слоев пептидов $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ замыкаются друг на друга, образуя филамент с трехслойной структурой, в которой заряженные боковые заместители аминокислотных остатков экспонированы наружу, а гидрофобные метильные группы формируют внутреннюю прослойку филамента, контактирующую с полярным окружением только на торцевых поверхностях филамента.

Детали процесса перехода мономеров пептидов $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ из раствора в состав комплекса, а также взаимная ориентация пептидов внутри β -слоя филамента до конца не выяснены. Тем не менее известно, что наиболее протяженные филаменты образуются при физиологических значениях pH и концентрациях солей не более 0.5 М, причем не только в простых водных растворах, но и в биогенных жидкостях, таких как плазма крови или цереброспинальная жидкость [12, 13]. Механические свойства биогелей, получаемых на основе полярных комплементарных пептидов, могут в некоторой степени различаться в зависимости от типа аниона, присутствующего в составе соединения вследствие добавления к исходному раствору пептида для инициации гелеобразования, что косвенно подтверждает роль, которую анионы играют в процессах формирования пространственных структур на основе биомолекул [14].

При изучении особенностей структуры и стабильности двуслойных пептидных комплексов с компоновкой разного типа, сложенных из параллельных или антипараллельных β -слоев пептидов $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$, нами был использован метод молекулярной динамики. Частично работа была начата ранее, и предварительные результаты использованы в настоящем исследовании в качестве важных примеров сравнения [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для данного исследования были созданы два типа пространственных структур филамента — двуслойного комплекса, состоящего из 24 пептидов $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ в β -конформации. В работе использовали пептидные комплексы с двумя β -слоями (L1 и L2) в *syn*- и *anti*-ориентациях, в том числе изучали конфигурации со смещенными относительно друг друга слоями.

Результаты молекулярной динамики позволяют говорить о том, что геометрия комплекса 24 антипараллельных пептидов DAN24 при 300 К консервативна, что определяется устойчивым положением атомов пептидных остовов в составе β -слоев, стабилизированных межмолекулярными водородными связями внутри каждого слоя (рис. 1, 2). Несколько более лабильны остатки А в положениях 14–4 у пар пептидов 1–2, остатки А в положениях 2–3 и 3–4 первого слоя L1, а также в

положениях 2–14 остатков А пары пептидов 11–12 второго слоя L2. Структура комплекса характеризуется неравномерным распределением по вертикали расстояний между пептидными парами в двух слоях комплекса.

Несколько сближены в вертикальной плоскости пептидные остовы у пар 1–2, 3–4, 5–6, 7–8, 9–10, 11–12, в результате структура комплекса протофиламента напоминает сборку из шести двуслойных тетрамеров антипараллельных пептидов (табл. 1, 2). Расстояния между C_β -атомами остатков А в 8-м положении пептидов комплекса DAN24 не изменяются существенным образом в ходе эксперимента, что указывает на стабильную конфигурацию структуры в целом (рис. 3).

Результаты определения расстояний между C_α -атомами остатков аланина в положениях 4 (рис. 4а) и в центральном положении 8 (рис. 4б) в β -слоях L1 и L2 пептидов комплекса 24 DAN24

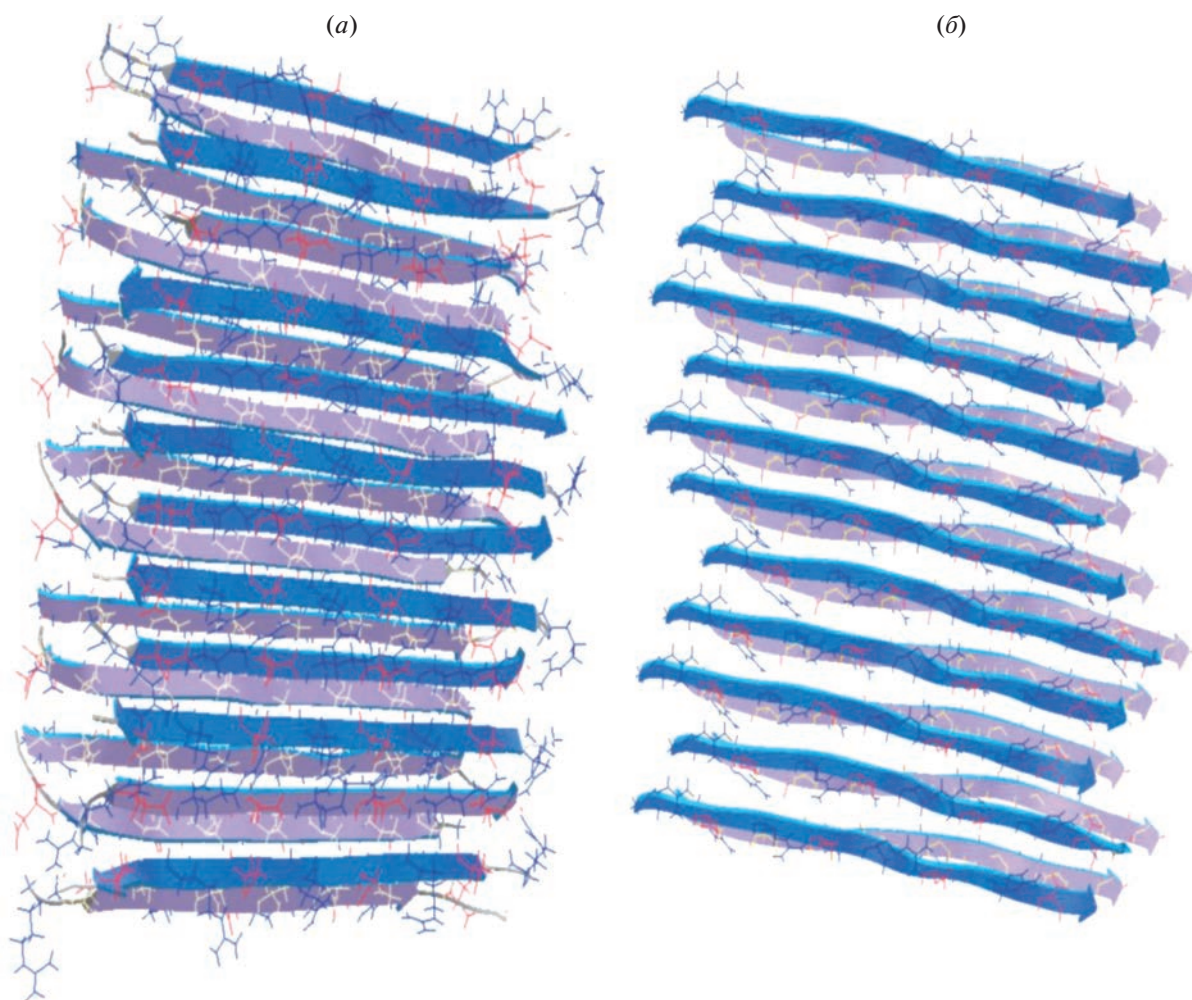


Рис. 1. Строение комплексов 24 пептидов $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$: (а) — комплекс антипараллельных пептидов DAN24; (б) — комплекс параллельных пептидов с “выровненными” краями DSS24 в *syn*-ориентации. Стрелками обозначены направления от *N*- к *C*-концам пептидных остовов [15].

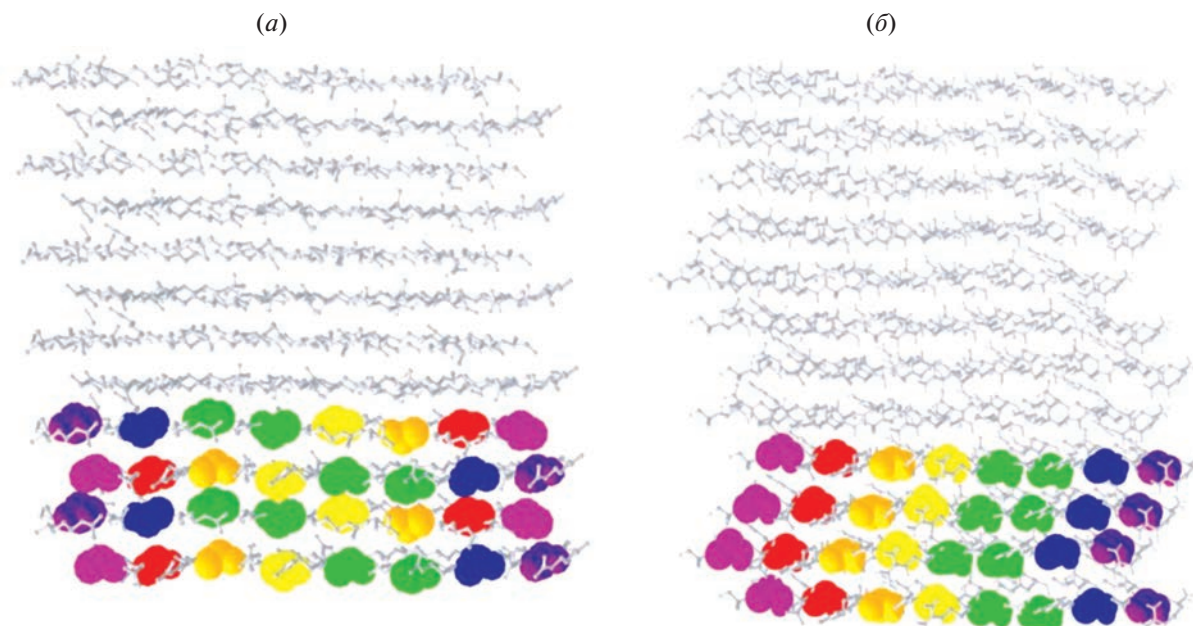


Рис. 2. Относительное расположение остатков А в двуслойных комплексах 24 пептидов. Остатки А в позициях 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 молекул пептидов H-(RADA)₄-OH на четырех из 12 уровней обозначены разными цветами: фиолетовым, синим, зеленым, желтым, оранжевым и красным соответственно. (а) – Двуслойный комплекс 24 антипараллельных пептидов DAN24; (б) – двуслойный комплекс 24 параллельных пептидов DSS24 в *syn*-ориентации. Для комплекса антипараллельных пептидов DAN24 попарные расстояния измеряли между атомами аминокислотных остатков А, расположенных в разных позициях в пептиде. Для комплекса DAN24 расстояния измеряли между атомами остатков, обозначенных идентичным цветом [15].

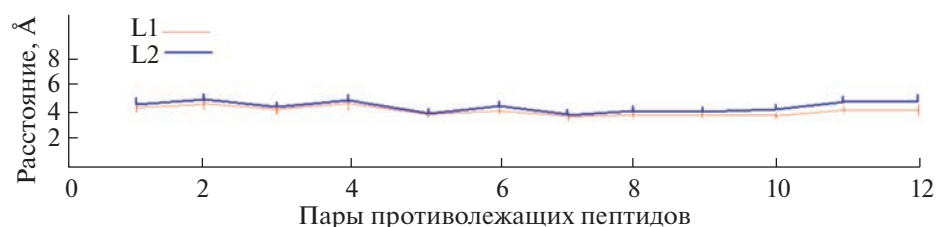


Рис. 3. Расстояние между C_β-атомами остатков А в положении 8 для пар пептидов в комплексе 24 антипараллельных пептидов DAN24 для β-слоев L1 и L2.

Таблица 1. Расстояния между C_α-атомами остатков А соседних пептидных остовов в комплексе 24 антипараллельных пептидов DAN24 (слой L1, 300 K) [15]

Пары пептидов	12–4	10–6	8–8	6–10	4–12	2–14
1–2	6.52 ± 0.2	6.49 ± 0.2	6.51 ± 0.2	6.50 ± 0.2	6.51 ± 0.2	6.56 ± 0.2
2–3	4.97 ± 0.2	4.87 ± 0.1	4.87 ± 0.1	4.89 ± 0.1	4.84 ± 0.1	5.45 ± 0.4
3–4	6.57 ± 0.2	6.55 ± 0.2	6.50 ± 0.1	6.54 ± 0.2	6.49 ± 0.2	5.64 ± 0.6
4–5	4.88 ± 0.2	4.87 ± 0.1	4.87 ± 0.1	4.87 ± 0.1	4.89 ± 0.1	4.95 ± 0.2
5–6	6.62 ± 0.2	6.52 ± 0.1	6.49 ± 0.1	6.52 ± 0.1	6.48 ± 0.1	6.54 ± 0.2
6–7	4.88 ± 0.2	4.90 ± 0.1	4.87 ± 0.1	4.86 ± 0.1	4.91 ± 0.1	4.86 ± 0.2
7–8	6.62 ± 0.2	6.53 ± 0.2	6.49 ± 0.1	6.53 ± 0.1	6.49 ± 0.1	6.51 ± 0.2
8–9	4.93 ± 0.2	4.90 ± 0.1	4.89 ± 0.1	4.86 ± 0.1	4.89 ± 0.1	4.86 ± 0.2
9–10	6.57 ± 0.2	6.53 ± 0.2	6.51 ± 0.1	6.51 ± 0.1	6.47 ± 0.1	6.50 ± 0.2
10–11	4.86 ± 0.2	4.83 ± 0.2	4.89 ± 0.1	4.91 ± 0.2	4.94 ± 0.2	4.95 ± 0.2
11–12	6.58 ± 0.2	6.60 ± 0.2	6.45 ± 0.2	6.56 ± 0.2	6.42 ± 0.2	6.38 ± 0.3

Примечание: приведены средние величины расстояний (Å) и дисперсии. Первая строка – позиции остатков А в соседних по вертикали пептидах, между которыми измеряется расстояние; первый столбец – пептидные молекулы в том слое, между остатками А которого определяется расстояние.

Таблица 2. Расстояния между C_{α} -атомами остатков А соседних пептидных остовов в комплексе 24 анти-параллельных пептидов DAN24 (слой L2, 300 К) [15]

Пары пептидов	12–4	10–6	8–8	6–10	4–12	2–14
1–2	4.61 ± 0.4	4.88 ± 0.4	4.37 ± 0.4	4.78 ± 0.4	4.26 ± 0.4	4.11 ± 0.4
2–3	5.14 ± 0.4	4.75 ± 0.4	5.24 ± 0.4	5.01 ± 0.4	5.45 ± 0.4	5.85 ± 0.5
3–4	4.23 ± 0.4	4.85 ± 0.4	4.34 ± 0.4	4.76 ± 0.4	4.19 ± 0.4	4.11 ± 0.4
4–5	5.25 ± 0.4	5.04 ± 0.4	5.23 ± 0.4	4.93 ± 0.4	5.35 ± 0.4	5.42 ± 0.5
5–6	4.13 ± 0.4	4.73 ± 0.4	4.35 ± 0.4	4.63 ± 0.4	4.34 ± 0.4	4.62 ± 0.5
6–7	5.49 ± 0.4	4.89 ± 0.3	5.16 ± 0.4	5.01 ± 0.4	5.28 ± 0.4	5.12 ± 0.5
7–8	4.66 ± 0.5	4.82 ± 0.4	4.42 ± 0.4	4.68 ± 0.4	4.35 ± 0.5	4.39 ± 0.5
8–9	5.33 ± 0.5	4.84 ± 0.3	5.28 ± 0.4	5.12 ± 0.4	5.40 ± 0.6	5.11 ± 0.5
9–10	4.30 ± 0.4	4.84 ± 0.4	4.34 ± 0.4	4.73 ± 0.5	4.30 ± 0.5	4.68 ± 0.6
10–11	5.33 ± 0.5	4.94 ± 0.4	5.35 ± 0.4	4.84 ± 0.3	4.94 ± 0.4	4.92 ± 0.5
11–12	4.17 ± 0.4	4.32 ± 0.4	4.13 ± 0.3	4.42 ± 0.5	4.20 ± 0.4	5.87 ± 2.0

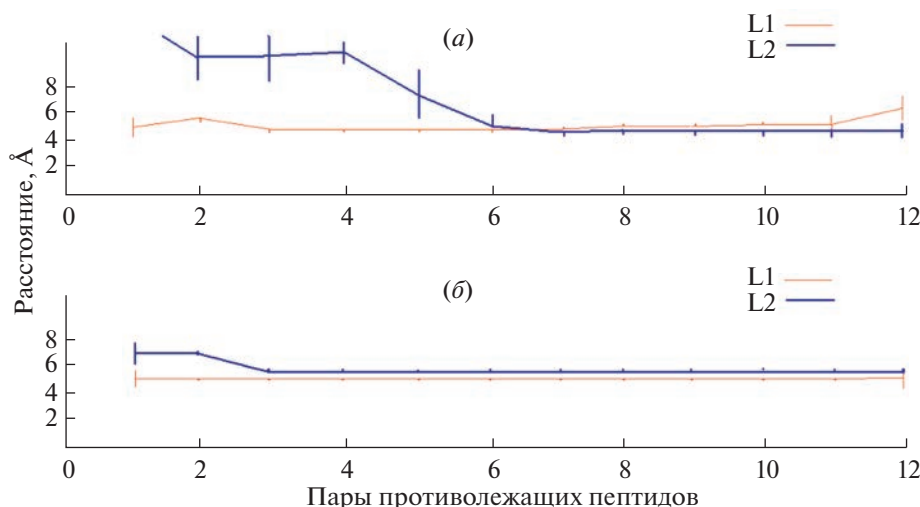
Примечание: приведены средние величины расстояний (Å) и дисперсии. Первая строка – позиции остатков А в соседних по вертикали пептидах, между которыми измеряется расстояние; первый столбец – пептидные молекулы в том слое, между остатками А которого определяли расстояние.

позволяют выявить тенденцию, отражающую большую степень отклонения координат групп атомов, расположенных вблизи торцевых поверхностей комплекса пептидов. Кроме того, изменение положений групп атомов отличается для каждого из рассмотренных слоев L1 и L2 комплекса DAN24.

Наименьшей устойчивостью β -конформации пептидных остовов в комплексе 24 параллельных пептидов DSS24 с β -слоями в *syn*-ориентации, которые условно выровнены относительно друг друга (рис. 1б), обладают пары пептидов, расположенные ближе к торцевой поверхности комплекса (рис. 5). Возможно, это объясняется эффектом одноименных зарядов в противолежащих слоях L1 и L2 пептидов, особенно на краях, где понижена стабилизирующая роль гидрофобных взаимодействий между слоями и водородных связей внутри β -слоев ввиду большей доступности мо-

лекул пептидов к взаимодействию с полярным окружением. Распределение расстояний между C_{β} -атомами остатков А в комплексе 24 параллельных пептидов DSS24 с выровненными слоями в *syn*-ориентации, в значительной мере повторяет ситуацию, определенную для C_{α} -атомов остатков аланина в пептидах, характеризующихся наибольшим изменением координат групп атомов аланиновых остатков, расположенных на флангах пептидов ($C4 > C8$), а также в пептидах, прилегающих к поперечным торцевым поверхностям двуслойного комплекса – пары пептидов 1, 2, 3, 12 (рис. 5).

Анализ углов Φ – Ψ аминокислотных остатков, сопряженных пептидной связью, позволяет охарактеризовать конформационные особенности начального и конечного состояний изучаемого объекта и сравнить стабильность исходной конфигурации комплексов [16]. На диаграмме

**Рис. 4.** Расстояние между C_{α} -атомами остатков А в положениях 4 (а) и 8 (б) для пар пептидов в комплексе 24 анти-параллельных пептидов DAN24 для β -слоев L1 и L2.

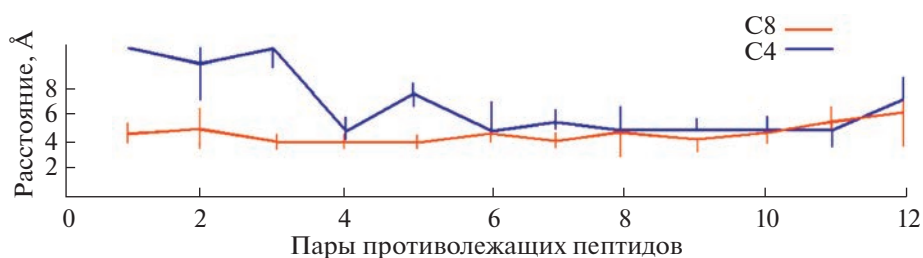


Рис. 5. Расстояние между C_β -атомами остатков А в положениях 4 и 8 для пар пептидов в комплексе 24 параллельных пептидов DSS24.

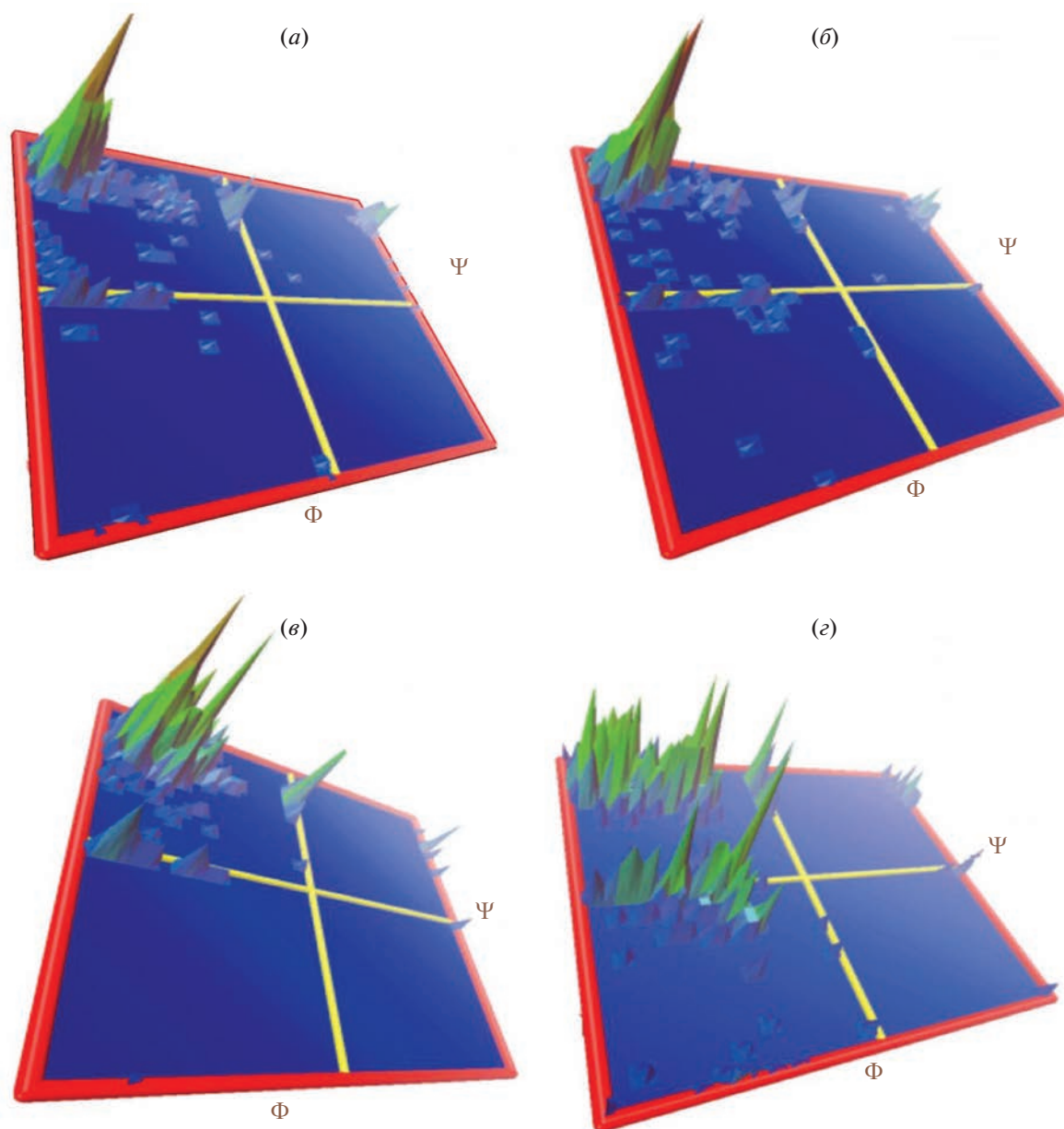


Рис. 6. Карты Рамачандрана для комплексов 24 пептидов $\text{H}-(\text{RADA})_4\text{-OH}$ в ходе эксперимента по молекулярной динамике: (а, б) – начальное и конечное состояния комплекса 24 антипараллельных пептидов DAN24; (в, г) – начальное и конечное состояния комплекса 24 параллельных пептидов DSS24 с “выровненными” слоями в *syn*-ориентации [15].

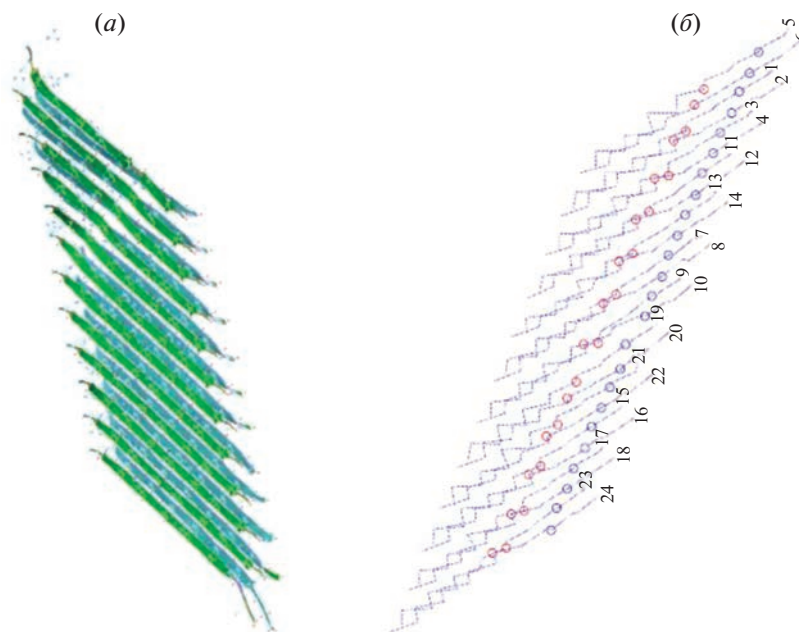


Рис. 7. (а) — Комплекс 24 параллельных пептидов NDSS24, смещенных в двух плоскостях относительно друг друга, с β -слоями в *syn*-ориентации; (б) — схема расположения атомов углерода остатков А в положениях 4 (выделено синим) и 8 (выделено красным) на остовах пептидов, остатки пронумерованы.

(рис. 6) отображены карты Рамачандрана структур двух видов комплексов в начальной и конечной точках молекулярной траектории. Величины пиков отражают количество аминокислотных остатков с указанными характеристиками пептидной связи. Рис. 6а и 6б характеризуют углы пептидных связей комплекса 24 антипараллельных пептидов H-(RADA)₄-OH (DAN24). В этом случае практически все значения анализируемых углов Φ — Ψ в начальной (рис. 6а) и конечной (рис. 6б) фазах траектории молекулярной динамики локализованы в левом верхнем квадранте, что соответствует β -конформации пептидной структуры. Данный факт также указывает на стабильность структуры комплекса антипараллельных пептидов DAN24 в условиях эксперимента. Результаты, полученные при изучении изменения углов пептидной связи в комплексе 24 параллельных молекул H-(RADA)₄-OH комплекса DSS24 с “выровненными” слоями в *syn*-ориентации показывают, что значительное количество пептидов в ходе эксперимента при 300 К изменяет начальную β -конформацию (рис. 6б, 6г). Данное обстоятельство позволяет охарактеризовать структуру комплекса DSS24 как менее стабильную по сравнению с комплексом пептидов в антипараллельной ориентации DAN24, в котором за время эксперимента исходную β -конформацию сохраняет большинство пептидов. Этот вывод подтверждается вычисленными величинами среднеквадратичного отклонения координат атомов анализируемых комплексов, наблюдаемых в ходе эксперимента.

Для проверки влияния одноименных зарядов на стабильность комплекса 24 параллельных пептидов мы создали и охарактеризовали альтернативный вариант структуры комплекса NDSS24, в которой не только соседние параллельные пептиды в каждом слое, но и сами слои в *syn*-ориентации смещены относительно друг друга (рис. 7). Чередование заряженных и нейтральных боковых заместителей в составе молекулы H-(RADA)₄-OH позволяет использовать смещение взаимного положения остовов параллельных пептидов с целью минимизации отталкивания одноименных зарядов. На рис. 8 приведены диаграммы расстояний между C_β -атомами остатков аланина в положениях 4 и 8, полученные при 80 и 300 К. Видно, что центральные области пептидов, составляющих филамент, более “раздвинуты” (6.5–7.0 Å) по сравнению с фланговыми областями (C_4), где расстояние между слоями составляет 4.2–5.0 Å, кроме пар пептидов 1 и 12, приближенных к торцевым поверхностям комплекса филамента. Данная тенденция сохраняется для двух значений температуры и может подразумевать возможность более сложной динамики комплекса, способной повлиять на структуру или форму филамента.

Величины среднеквадратичного отклонения координат центров масс атомов, вычисленные по результатам эксперимента, указывают на то, что комплекс DAN24, сформированный антипараллельными пептидами H-(RADA)₄-OH, конформационно наиболее стабилен.

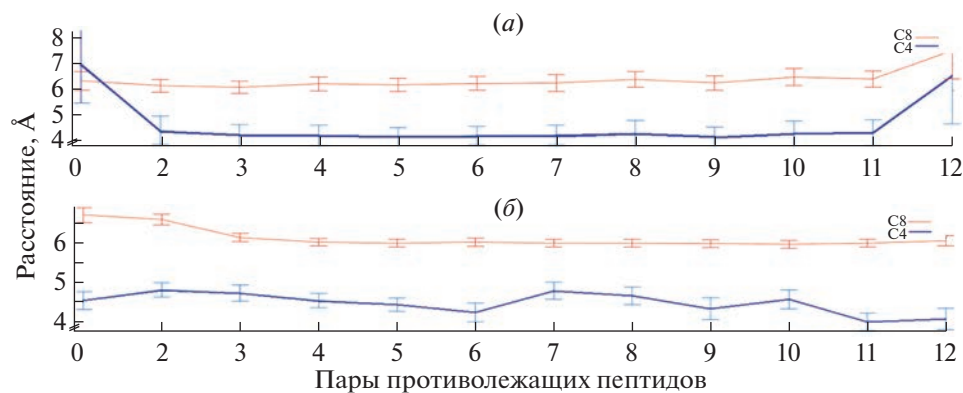


Рис. 8. Расстояние между C_β-атомами остатков А в положениях 4 и 8 для пар пептидов в комплексе 24 параллельных пептидов NDSS24 при 80 К (а) и 300 К (б).

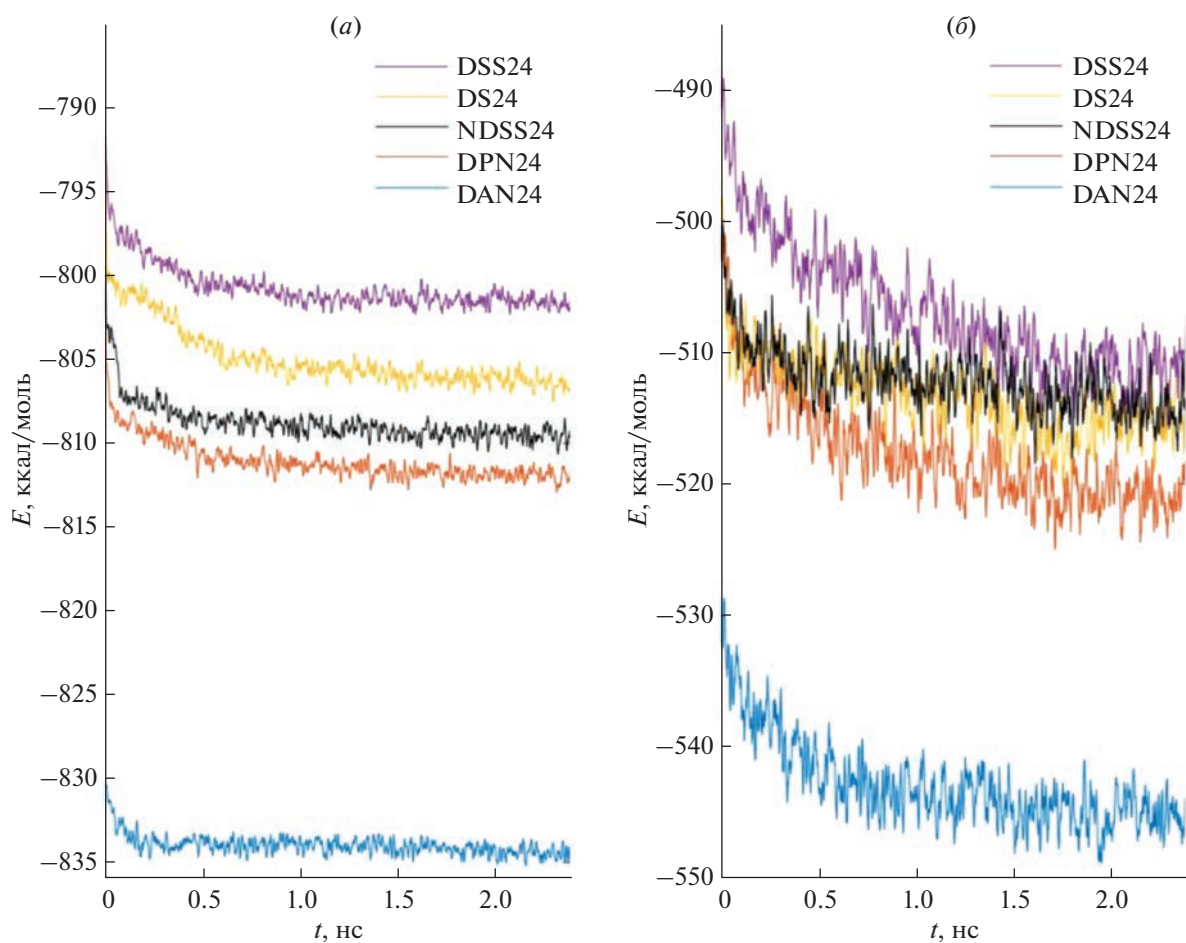


Рис. 9. Изменение внутренней энергии E различных комплексов 24 пептидов H-(RADA)₄-OH в ходе эксперимента по молекулярной динамике при 80 К (а) и 300 К (б). Приведены средние величины E в пересчете на один пептид.

Дополнительная характеристика, которая может быть использована для сравнения комплексов пептидов, — это величина свободной энергии:

$E = E_{MM} + E_{solv}$, которая складывается из молекулярно-механической энергии атомов и энергии сольватации, отражающей потенциал поверх-

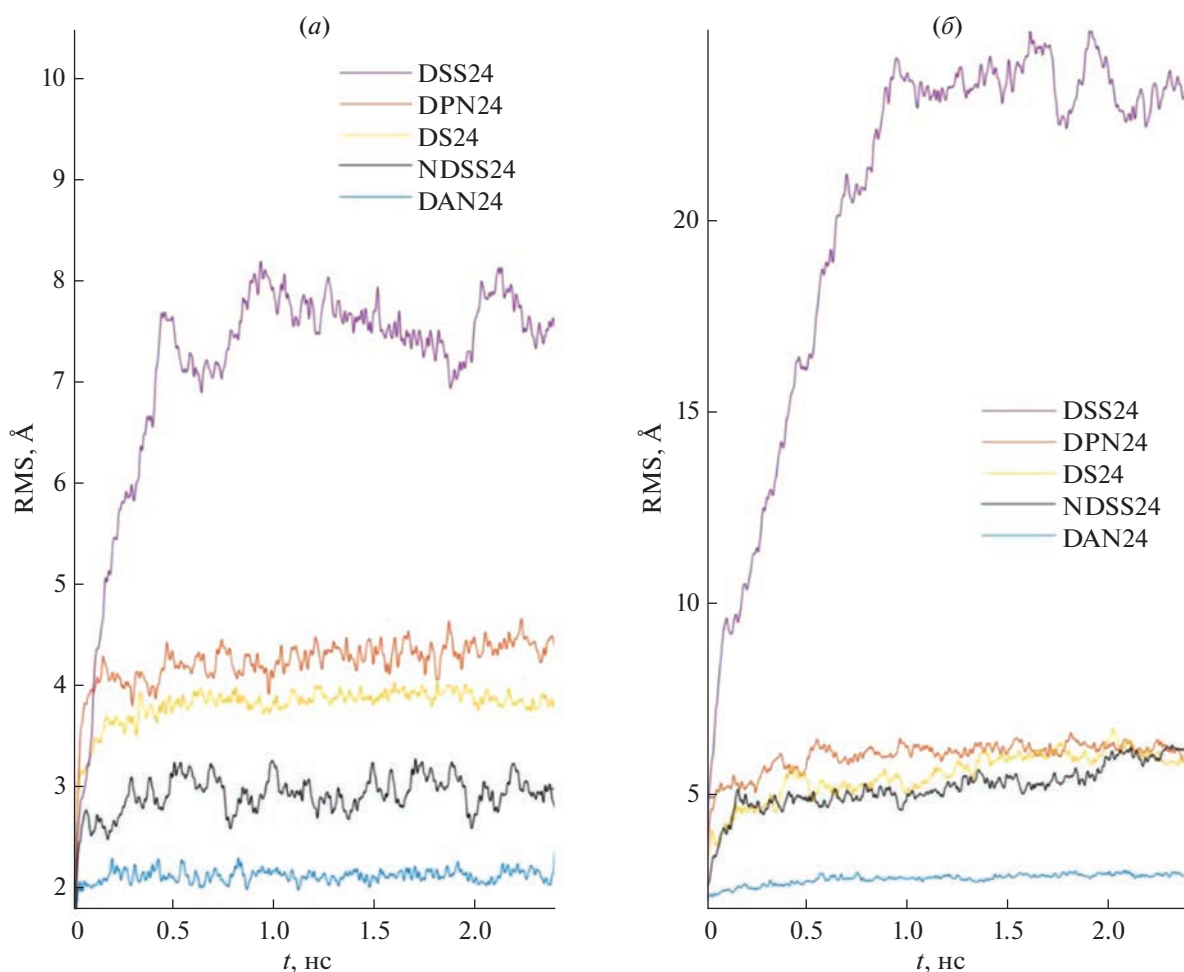


Рис. 10. Отклонение координат атомов (RMS) для различных комплексов 24 пептидов H-(RADA)₄-ОН в ходе эксперимента по молекулярной динамике при 80 К (а) и 300 К (б). Приведены средние величины отклонения координат атомов от исходного положения в пересчете на один пептид.

ностных взаимодействий с полярным окружением. На рис. 9 приведены графики изменения свободных энергий комплексов, состоящих из 24 антипараллельных пептидов H-(RADA)₄-ОН, и нескольких вариантов комплексов 24 параллельных пептидов со слоями в *sup*-ориентации.

Результаты молекулярной динамики показали, что наиболее компактной и стабильной структурой обладает комплекс DAN24, сформированный 24 антипараллельными пептидами H-(RADA)₄-ОН в *anti*-ориентированных β-слоях. Структура комплекса NDSS24 из 24 параллельных пептидов, смещенных относительно друг друга в двух плоскостях, оказалась устойчивой и более стабильной, чем структура комплекса 24 параллельных пептидов DSS24 с “выровненными” краями, который частично описан ранее [15].

Наибольшее изменение начальной конформации пептидных остовов при 300 К отмечено в областях, прилегающих к торцевым поверхностям

лентовидного филамента, где срединный гидрофобный слой, сформированный боковыми заместителями остатков аланина, непосредственно контактирует с полярным окружением. По мере удаления от горизонтальных торцевых “срезов” комплекса протофиламента (пары пептидов 1, 2, 11, 12) расстояния между соседними остовами пептидов и отклонения координат групп атомов от начального положения (RMS) уменьшаются, что указывает на снижение степени деформации их начальной геометрии (рис. 10).

Ранее мы сообщали о некоторых особенностях структуры тетрамеров антипараллельных полярных самоорганизующихся пептидов [16]. Все наши предыдущие данные были также получены с использованием программы Amber11 [17]. Было показано, что тетрамеры антипараллельных пептидов могут выступать в качестве минимальной структуры, достаточной для сборки протяженного филамента. Данное предположение подтверждается способностью продуктов ультра-

звуковой дезинтеграции протяженного филамента из пептидов H-(RADA)₄-OH сохранять характеристические признаки протофиламентов, способных участвовать в восстановлении протяженного филамента после возвращения в нормальные условия [18]. В общем случае изменение геометрии протофиламента, сложенного из антипараллельных пептидов в β -конформации (DAN24), как показано на рис. 10, оказывается существенно меньшим по сравнению с комплексом параллельных пептидов в составе двух β -слоев в *sup*-ориентации (DSS24 и NDSS24). В частности, для комплексов параллельных пептидов H-(RADA)₄-OH с выровненными краями слоев (DSS24) отмечена существенно большая девиация координат аминокислотных остатков А, расположенных на флангах пептидов, чем в комплексе NDSS24, в котором остовы соседних пептидов и противолежащие слои смещены относительно друг друга с целью минимизации взаимного отталкивания равных зарядов в соседних пептидах. Эти особенности компоновки структуры существенно повлияли на термодинамику комплекса NDSS24 и его стабильность.

Можно видеть (рис. 9), что абсолютные величины свободных энергий для комплексов антипараллельных (DAN24) и параллельных пептидов (DSS24, NDSS24) различаются, при этом более низкая величина энергии характеризует комплекс антипараллельных пептидов DAN24. В пользу большей стабильности данной структуры говорит то, что в ходе эксперимента по молекулярной динамике величина свободной энергии комплексов 24 пептидов понижается, достигая локального минимума к отметке 1.5 нс, сохраняясь далее на этом уровне до конца эксперимента. Величина свободной энергии комплекса 24 антипараллельных пептидов составила –833 и –545 ккал/моль при 80 и 300 К соответственно. Для комплекса 24 параллельных пептидов DPN24 со слоями в *anti*-ориентации величина свободной энергии составила –812 и –520 ккал/моль при 80 и 300 К соответственно. Для комплексов 24 параллельных пептидов со слоями в *sup*-ориентации DS24 и DSS24 величины свободной энергии составили –806 и –801 ккал/моль при 80 К и –514 и –508 ккал/моль при 300 К соответственно [15]. Термодинамические характеристики комплекса 24 параллельных пептидов NDSS24 со слоями в *sup*-ориентации приближаются к показателям комплекса антипараллельных пептидов, составляя –808 и –514 ккал/моль при 80 и 300 К соответственно (рис. 9), хотя в ходе эксперимента по молекулярной динамике величина энергии не достигает значений, характерных для комплекса антипараллельных пептидов DAN24. Таким образом, несмотря на то что комплексы параллельных пептидов DS24 и DSS24 характеризуются большими величинами свободной энергии по сравнению с комплексом антипараллельных пептидов DAN24,

данный факт не исключает возможность образования стабильных структур параллельными пептидами, что подтверждается относительной стабильностью комплексов параллельных пептидов H-(RADA)₄-OH типа DPN24 [15] или NDSS24. Данные системы термодинамически устойчивы благодаря особенностям взаимного расположения пептидов в слоях и самих слоев в составе комплекса [19].

Полученный результат позволяет не только соотнести геометрии исследуемых структур, но также сравнить их с другими моделями, разработанными с учетом экспериментальных данных, полученных физико-химическими методами, в том числе ЯМР [20]. Чувствительность физико-химических методов не позволяет пока обеспечить разрешение, достаточное для детального рассмотрения внутреннего строения пептидного комплекса, а опубликованные выводы относительно взаимной ориентации пептидных остовов в составе двуслойного комплекса, состоящего из β -слоев, противоречивы [21]. Именно по этой причине мы использовали метод молекулярной динамики для оценки характеристик возможной структуры протофиламента.

Результаты, полученные в данной работе, указывают на то, что антипараллельная укладка пептидных остовов в составе комплекса обеспечивает не только минимальную свободную энергию структуры (рис. 9), но и наименьшую среднеквадратичную величину отклонения координат атомов (RMS, Å) от начальной позиции при 300 К (рис. 10).

По результатам работы можно сделать вывод, что наиболее стабильна структура двуслойного комплекса, сложенная из 24 антипараллельных пептидов (12 пар) DAN24. В то же время кроме бислойной структуры комплекса 24 параллельных пептидов DPN24 с β -слоями в *anti*-ориентации, предложенной ранее [15], также стабильной оказалась новая структура – комплекс 24 параллельных пептидов NDSS24 с двумя β -слоями в *sup*-ориентации, где пептиды в слоях смещены относительно друг друга, и сами слои смещены относительно друг друга с целью уменьшить взаимное отталкивание одноименных зарядов групп атомов в пептидах противоположных слоев комплекса. Примечательно, что при 300 К “конформационная подвижность” комплексов DPN24 и NDSS24 характеризуется близкими величинами RMS ~5 Å, что указывает на близкую эффективность способов минимизации взаимного отталкивания равных зарядов противолежащих слоев, реализованных в настоящем исследовании. Очевидно, что данный факт необходимо учитывать при рассмотрении всех особенностей начальных этапов процесса образования

филамента в ходе самоорганизации молекул пептида H-(RADA)₄-OH.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пространственные модели филамента. Для данного исследования были созданы два прототипа структуры филамента: в виде двуслойного комплекса пептидов H-(RADA)₄-OH в β -конформации, состоящего из 24 параллельных пептидов с двумя β -слоями в *syn*-ориентации, а также 24 антипараллельных пептидов из двух β -слоев в *anti*-ориентации. Во всех случаях боковые гидрофобные заместители аланинов находились внутри двуслойного филамента, формируя своеобразную гидрофобную “начинку”. Процесс моделирования происходил поступательно с использованием пакета программ HyperChem8 [22], начиная с конструирования единичной структуры пептида H-(RADA)₄-OH в β -конформации и сохранением данных о координатах атомов модели в PDB-файле. Созданную модель пептида последовательно использовали для молекулярного докинга, реализованного на основе программного пакета HEX v6.1 [23] без учета кулоновских взаимодействий, сначала для получения комплексов пар молекул, затем тетрамеров и в последующем — комплексов более высокого порядка с соответствующей взаимной ориентацией пептидных остовов. Процедуру молекулярного докинга повторяли с использованием альтернативного программного продукта GRAMM-X [24] с учетом геометрии контактирующих субстратов, но без учета кулоновских взаимодействий. Результаты молекулярного докинга, полученные с использованием двух альтернативных программ, оказались практически идентичными. Построенные модельные структуры с минимальной энергией использовали в качестве исходных объектов исследования в дальнейших экспериментах в виде PDB-файлов координат атомов соответствующих комплексов.

Подготовка проб. Состояние протонирования заряженных аминокислотных остатков было выбрано соответствующим рН 7.0. Модельные структуры пептидов минимизировали по энергиям, осуществляя три последовательные серии оптимизации с учетом кулоновских взаимодействий. Каждая серия состояла из 500 циклов, с промежуточным “встряхиванием” атомов структуры перед началом следующей процедуры с целью уменьшения вероятности остановки процесса оптимизации в локальном энергетическом минимуме. Минимизацию энергии продолжали до момента “отсечки”, при котором разность ΔE величин энергий двух последовательных серий в ходе минимизации энергии становилась менее выбранного “порогового” значения -1.0 кДж/моль, при использовании параметрического силового поля GROMOS96-43B, реализованного в программе

Swiss-PdbViewer v.4.1.0 [25]. Файлы координат атомов, соответствующие полученным моделям, в формате PDB использовали в качестве исходных данных о начальном состоянии объекта при проведении экспериментов по молекулярной динамике.

Молекулярная динамика. Моделирование молекулярной динамики комплекса белков и лиганда, а также последующий анализ результатов осуществляли с использованием пакета программ Amber11 [17]. Моделирование динамики комплексов проводили без учета явного водного окружения в силовом поле AMBER ff03 [26] при 300 К. В результате исполнения протокола, аналогичного использованному ранее, были рассчитаны молекулярные траектории для экспериментальных структур и комплексов 24 пептидов [27]. В каждом случае сначала энергию системы минимизировали при фиксированном положении координат атомов полипептидов, чтобы упорядочить атомарные взаимодействия, затем молекулярную систему разогревали до выбранной температуры и вычисляли молекулярно-динамическую траекторию атомов исследуемой структуры длительностью не менее 2.4 нс с помощью управляющего файла [15].

Полученные молекулярные траектории визуализировали с использованием программы VMD v1.9.1 [28]. Свободную энергию комплексов вычисляли с использованием обобщенного метода Борна, точность которого оказалась приемлемой, с учетом условий моделирования динамики молекул и относительно стабильной конформации структур, изучаемых в эксперименте [29]. Расстояния между атомами аминокислот пептидов вычисляли с использованием пакета программ CPPTRAJ, который выступает частью пакета AMBER v11. Геометрию пептидных остовов (вторичную структуру) классифицировали согласно общепринятому способу Kabsch и Sander [30]. Соответствующие расчеты проводили на кластере K-60 Института прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе, используя метод молекулярной динамики, сравнили пять видов комплексов 24 пептидов H-(RADA)₄-OH, в том числе впервые был охарактеризован вид комплекса параллельных пептидов NDSS24. Результаты показали, что наиболее стабильными оказались структуры DAN24 (из антипараллельных пептидов) и NDSS24 (из параллельных пептидов со смещенными слоями в *syn*-ориентации). Структуры DAN24 и NDSS24 обладают более низкой свободной энергией и характеризуются меньшим смещением атомов от начальных координат по сравнению с комплексом DSS24 (из параллельных пептидов с “выровненными” краями слоев в *syn*-

ориентации). Метильные группы боковых заместителей остатков А в комплексе DAN24 характеризуются равномерным распределением центров масс атомов углерода метильных групп остатков А, расположенных в центральном гидрофобном слое. При этом атомы углерода метильных групп характеризуются большей вариабельностью расстояний между атомами остатков А противоположащих слоев на краях филамента. Это указывает на более высокую лабильность групп атомов гидрофобного слоя по сравнению с C_α-атомами пептидных остовов. Вероятно, центральный гидрофобный слой филамента обладает сравнительно высокой пластичностью, что способствует сохранению целостности всей структуры, обеспечивая компенсацию напряжений, вызываемых смещением групп атомов внешних слоев комплекса вследствие термического или химического воздействия.

Полученные результаты дают большее понимание возможных способов самоорганизации пептидов в растворе, а также облегчают рациональный подход к конструированию модифицированных молекул самоорганизующихся пептидов для одновременной реализации двух свойств — образования филамента и изменения функциональных свойств поверхностей филамента (тропизма) в отношении лекарственных веществ или клеток определенного типа путем экспонирования добавленных модификаторов в окружающую среду. Работы в данном направлении обеспечат получение результатов, позволяющих использовать самоорганизующиеся пептиды не только в качестве лекарственного “депо”, но и как искусственный матрикс для широкого применения в регенеративной медицине.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность академику РАН В.Т. Иванову за интерес, проявленный к теме изучения самоорганизующихся структур, а также всеобъемлющее и глубокое обсуждение промежуточных результатов работы, ставшее мощным побудительным мотивом к развитию направления по изучению молекулярной динамики самоорганизующихся пептидов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках программы “Неклинические исследования биомедицинских технологий и биофармацевтических продуктов” (№ ЕГИСУ (гос. регистрации) АААА-А19-119021590083-3, код темы FMFM-2019-0036), а также частично 075-00381-21-00 и 0017-2019-0009.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ovchinnikov Yu.A., Ivanov V.T. // In: The Proteins. 3rd edition / Eds. Neurath H., Hill R.L. New York: Acad. Press, 1982. V. 5. P. 307–642. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(84\)90081-6](https://doi.org/10.1016/0161-5890(84)90081-6)
2. Collier J.H., Rudra J.S., Gasiorowski J.Z., Jung J.P. // Chem. Soc. Rev. 2010. V. 39. P. 3413–3424. <https://doi.org/10.1039/b914337h>
3. Seyedkarimi M.S., Mirzadeh H., Bagheri-Khoulenjani S. // J. Biomed. Mat. Res. Part A. 2019. V. 107. P. 330–338. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36495>
4. Zhang S.G., Holmes T.C., Diersio C.M., Hynes R.O., Su X., Rich A. // Biomaterials. 1995. V. 16. P. 1385–1393. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)96874-y](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)96874-y)
5. Kumada Y., Zhang S. // PLoS One. 2010. V. 5. P. e10305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010305>
6. Naotaro Akiyama N., Yamamoto-Fukuda T., Takahashi H., Koji T. // Int. J. Nanomed. 2013. V. 8. P. 2629–2640. <https://doi.org/10.2147/IJN.S47279>
7. Zhang S.G., Lockshin C., Herbert A., Winter E., Rich A. // EMBO J. 1992. V. 11. P. 3787–3796. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05464.x>
8. Данилкович А.В., Липкин В.М., Удовиченко И.П. // Биоорг. химия. 2011. Т. 37. С. 780–785. [Danilkovich A.V., Lipkin V.M., Udovichenko, I.P. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2011. V. 37. P. 707–712.] <https://doi.org/10.1134/S1068162011060069>
9. Pauling L., Corey R.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1951. V. 37. P. 251–256. <https://doi.org/10.1073/pnas.37.5.251>
10. Zhang S., Holmes T., Lockshin C., Rich A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 3334–3338. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3334>
11. Zarei H., Aramvash A., Seyedkarimi M.S. // Int. J. Peptide Res. Therapeutics. 2019. V. 25. P. 265–272. <https://doi.org/10.1007/s10989-017-9669-2>
12. Altman M., Lee P., Rich A., Zhang S.G. // Protein Sci. 2000. V. 9. P. 1095–1105. <https://doi.org/10.1110/ps.9.6.1095>
13. Marcotte E.M., Pellegrini M., Yeates T.O., Eisenberg D.A. // J. Mol. Biol. 1999. V. 293. P. 151–160. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3136>
14. Chen Y.W., Ding F., Nie H.F., Serohijos A.W., Sharma S., Wilcox K.C., Yin Y.S., Dokholyan N.V. // Arch. Biochem. Biophys. 2008. V. 469. P. 4–19. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.05.014>
15. Данилкович А.В., Тихонов Д.А. // Препринты ИПМ им. М.В.Келдыша. 2019. № 72. 24 с. <https://doi.org/10.20948/prepr-2019-72>

16. Danilkovich A.V., Sobolev E.V., Tikhonov D.A., Udovichenko I.P., Lipkin V.M. // Dokl. Biochem. Biophys. 2012. V. 443. P. 96–99.
<https://doi.org/10.1134/S160767291202010X>
17. Simmerling C., Wang B., Woods R.J. // J. Computation. Chem. 2005. V. 26. P. 1668–1688.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20290>
18. Yokoi H., Kinoshita T., Zhang S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 8414–8419.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0407843102>
19. Zhang S., Lockshin C., Cook R., Rich A. // Biopolymers. 1994. V. 34. P. 663–672.
<https://doi.org/10.1002/bip.360340508>
20. Cormier A.R., Pang X., Zimmerman M.I., Zhou H.-X., Paravastu A.K. // ACS Nano. 2013. V. 7. P. 7562–7572.
<https://doi.org/10.1021/nn401562f>
21. Huang D., Zimmerman M.I., Martin P.K., Nix A.J., Rosenberry T.L., Paravastu A.K. // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. P. 2319–2328.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.04.004>
22. HyperChem® Computational Chemistry. Practical Guide – Theory and Method, HC 70-00-04-00. Gainesville: Hypercube Inc., 2002. 350 p.
23. Macindoe G., Mavridis L., Venkatraman V., Devignes M.-D., Ritchie D.W. // Nucleic Acids Res. 2010. V. 38. P. 445–449.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq311>
24. Tovchigrechko A., Vakser I. // Proteins. 2005. V. 60. P. 296–301.
<https://doi.org/10.1002/prot.20573>
25. VanGunsteren W.F., Billeter S.R., Eising A.A., Hunenberger P.H., Kruger P., Mark A.E., Scott W.R.P., Tironi I.G. // Biomol. Simulation. Zurich: Vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zurich, 1996. P. 1042.
26. Duan Y., Wu C., Chowdhury S., Lee M.C., Xiong G., Zhang W., Yang R., Cieplak P., Luo R., Lee T., Caldwell J., Wang J., Kollman P. // J. Computation. Chem. 2003. V. 24. P. 1999–2012.
<https://doi.org/10.1002/jcc.10349>
27. Danilkovich A.V., Sobolev E.V., Tikhonov D.A., Shadrina T.E., Udovichenko I.P. // Math. Biol. Bioinform. 2011. V. 6. P. 92–101.
<https://doi.org/10.17537/2011.6.92>
28. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // J. Mol. Graphics. 1996. V. 14. P. 33–38.
[https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
29. Onufriev A., Bashford D., Case D. // J. Phys. Chem. Part B. 2000. V. 104. P. 3712–3720.
<https://doi.org/10.1021/jp994072s>
30. Kabsch W., Sander C. // Biopolymers. 1983. V. 12. P. 2577–2637.
<https://doi.org/10.1002/bip.360221211>

Dynamics of 24 Self-Assembling H-(RADA)₄-OH Peptides Complexed in Bi-Layered Structure with Layers in *syn* and *anti* Orientation

A. V. Danilkovich*, #, D. A. Tikhonov**, ***, and V. M. Lipkin*

*Phone: +7 (496) 773-08-93; e-mail: danilkovich@bibch.ru

*Branch of Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS,
prosp. Nauki 6, Pushchino, 142290 Russia

**Institute of Mathematical Problems of Biology – the Branch of Keldysh Institute of Applied Mathematics,
Russian Academy of Sciences, ul. Vitkevicha 1, Pushchino, 142290 Russia

***Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, 142290 Russia

H-(RADA)₄-OH peptide in water tends to form biogels at physiological conditions. Thusly made scaffold is formed of fibrils resulted from peptides self-assembling. Fibrils have two external hydrophilic layers, while hydrophobic one is situated between of them. Bio gels by the H-(RADA)₄-OH peptides are considered to be a prominent source for designed extra cellular matrix aimed to cell cultures of different types. Little is known about detailed structure the filament structure and β -sheets peptide composition. We have designed and studied molecular dynamics of bi-layered protofilament structures with β -sheets formed of parallel or anti-parallel peptide chains. Method of molecular dynamics was used to study H-(RADA)₄-OH peptide complexes at 80 and 300 K. While the most stable peptide complex was found to consist of anti-parallel peptides, had the lowest free energy and the least deviation of atom coordinates, yet another stable structure of the peptide complex was identified as 24-mer of parallel peptides with two β -sheets placed in *syn* orientation. These results underlined the importance of factors, directing the initial stages of the H-(RADA)₄-OH peptide self-assembling in solution.

Keywords: self-assembly, scaffold, filament structure, polar peptides, H-(RADA)₄-OH