

# СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ПЕПТИДА $\alpha$ -ГАРПИНИНА Tk-hefu2 В ВОДЕ ПО ДАННЫМ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Лихоносова А.Ф.<sup>1,2</sup>, Чугунов А.О.<sup>2</sup>, Ефремов Р.Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Национальный исследовательский университет  
«Высшая школа экономики», Россия*

<sup>2</sup> *Институт биоорганической химии им. академиков  
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Россия*

alihonosova@gmail.com

Поступила 19.08.2016

$\alpha$ -Гарпинины – недавно открытое семейство пептидов, обладающих единым типом пространственной укладки полипептидной цепи – две  $\alpha$ -спирали, соединенные двумя дисульфидными связями, но при этом имеющих широкий спектр биологических активностей. Теоретически, взяв этот структурный мотив за основу, можно с помощью компьютерного дизайна и последующего синтеза создавать искусственные пептиды с желаемыми биологическими функциями.

В этой работе с помощью компьютерных расчетов исследовали молекулярную динамику модели биоинженерного пептида Tk-hefu2, структура которого неизвестна. Установлены два возможных состояния Tk-hefu2 в водном растворе и описаны их структурно-динамические параметры. Проведен анализ соответствия каждой из полученных моделей пептида функционально активному состоянию, способному связываться с потенциал-чувствительным калиевым каналом и блокировать его работу. Полученные результаты создают основу для понимания количественных структурно-функциональных взаимосвязей  $\alpha$ -гарпининов и рационального проектирования на их основе новых высокоэффективных блокаторов/модуляторов калиевых каналов.

УДК 531.78

## **Введение**

Биологическая функция белков неразрывно связана с их пространственной структурой, поскольку работа этих «молекулярных машин» всегда базируется на взаимодействии с молекулой-партнером. В недавних исследованиях [1-4] было изучено семейство  $\alpha$ -гарпининов – пептидов с единой пространственной укладкой: две антипараллельные  $\alpha$ -спирали, соединенные двумя дисульфидными связями. Эти пептиды различаются по аминокислотной последовательности и обладают широким спектром активности – от

нейрорегуляторной и ингибиторной до антимикробной, что позволило рассматривать их структуру как отправную точку для разработки пептидных агентов с заданной функцией. В частности, были синтезированы два биоинженерных пептида – Tk-hefu1 и Tk-hefu2 – на основе структурного шаблона антимикробного пептида Tk-AMP-X2 [1]. Несмотря на всего две или три произведенные точечные замены, функция этих пептидов кардинальным образом изменилась: вместо антимикробной, они стали обладать блокирующей активностью в отношении потенциал-чувствительных калиевых каналов.

Известно, что у к-хефутоксина-1 [5] – токсина из яда скорпиона, который имеет структуру, характерную для  $\alpha$ -гарпининов и является блокатором калиевого канала Kv1.3, – важной для функции является пара остатков Tyr-5 и Lys-19 (так называемая функциональная диада). Новый пептид Tk-hefu1 был получен путем переноса «диады» в состав Tk-AMP-X2 по соответствующим положениям – E6Y и M22K. Кроме того, была сделана дополнительная точечная замена 23 остатка Lys(+) на Glu(–) (K23E), так как известно, что положительный заряд в этом положении снижает активность пептида [6]. Полученный тройной мутант блокировал ток через канал Kv1.3 с концентрацией полунгибирования ( $IC_{50}$ ), равной 40 мкМ. Исходный пептид Tk-AMP-X2 такой активностью не обладал. Затем был синтезирован пептид, названный Tk-hefu2, путем внесения только диады Y-K в структурный шаблон Tk-AMP-X2 (без замены K23E). В результате его активность в отношении канала оказалась еще выше, чем у Tk-hefu1 (неопубликованные данные А. А. Василевского и сопр.). Пространственная структура Tk-hefu2 экспериментально не определена.

Исследование структурно-функциональных зависимостей  $\alpha$ -гарпининов на молекулярном уровне позволит понять, какие параметры являются важными для той или иной их функции. Это, в свою очередь, откроет путь к предсказанию с помощью компьютерного дизайна, где и какие точечные замены нужно сделать для получения пептида с нужной активностью. Для проведения таких компьютерных экспериментов в первую очередь необходимо изучить динамику  $\alpha$ -гарпининов в водном растворе, охарактеризовать их структурно-динамические параметры, понять, как происходит связывание пептидов с их мишенью в клетке – молекулой калиевого канала.

В данной работе с помощью метода молекулярной динамики было исследовано конформационное пространство Tk-hefu2 в явно заданном водном окружении, описаны структурно-динамические параметры пептида и предложены две наиболее вероятные модели его пространственной структуры.

Сравнительный анализ структурно-динамических и физико-химических свойств полученных конформационных состояний позволил сделать вывод о том, что потенциально биологически активным является лишь одно из них. Именно его следует в будущем брать за основу новых искусственных пептидов-мутантов – поровых блокаторов калиевых каналов.

## 1. Материалы и методы

Для построения модели пространственной структуры Tk-hefu2 использовали метод компьютерного моделирования на основании гомологии. В качестве стартовых моделей использовали известные структуры двух гомологичных Tk-hefu2 пептидов – Tk-hefu1 (биоинженерный пептид с функцией блокатора калиевого канала) и Tk-AMP-X2 (антимикробный пептид (АМП) из семян пшеницы), – в которые вносили точечные замены аминокислотных остатков (см. табл. 1). Затем проводили расчет молекулярной динамики (МД) с целью найти конформации, которые могут присутствовать в водном растворе в равновесном состоянии.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности природного антимикробного пептида Тк-AMP-X2 и двух биоинженерных пептидов — Тк-hefu1 и Тк-hefu2

Название пептида	Функция	PDB ID <sup>1</sup>	Аминокислотная последовательность <sup>2</sup>
Тк-AMP-X2	АМП	2M6A	ADDRCERMCQRYHDRREKKQCMKGCRYG
Тк-hefu1	Блокатор К-канала	(*) <sup>3</sup>	ADDRCYRMCQRYHDRREKKQCKEGCRYG
Тк-hefu2	Блокатор К-канала		ADDRCYRMCQRYHDRREKKQCKKGCRYG

<sup>1</sup> PDB ID — четырехзначный идентификатор для пространственных структур биомолекул, опубликованных в банке данных 3D структур белков и нуклеиновых кислот Protein Data Bank (PDB)

<sup>2</sup> Жирным шрифтом и нижним подчеркиванием обозначены те замены, которые были внесены в структуру Тк-AMP-X2

<sup>3</sup> Структура Тк-hefu1 получена в Лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН, но на данный момент не опубликована в PDB

### 1.1. Построение стартовой модели пептида Тк-hefu2

Пространственные структуры пептидов Тк-hefu1 и Тк-AMP-X2 были экспериментально получены в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН [1]. Структура Тк-hefu1 установлена, но пока не опубликована в базе PDB. В каждом PDB-файле содержится набор из 10 моделей структуры пептида, расшифрованных на основании данных спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Чтобы обеспечить наиболее полную выборку и собрать статистику для проверки воспроизводимости результатов, использовали 10 моделей Тк-AMP-X2 и 4 модели Тк-hefu1 (остальные 6 моделей практически идентичны этим четырем). Оба набора моделей Тк-hefu2, построенных на основе разных структурных шаблонов, имеют похожую конформацию, но, тем не менее, наблюдается несколько локальных отличий, являющихся ключевыми для их функций, например, углы скрещивания двух  $\alpha$ -спиралей, расстояние между аминокислотными остатками в функциональной диаде и др. Стартовые структуры модели Тк-hefu2 были получены путем *in silico* замены определенных боковых цепей в известных структурах в программе PyMol [7]. В случае шаблона Тк-AMP-X2 была произведена замена двух аминокислотных остатков (E6Y и M22K), в случае шаблона Тк-hefu1 — одна замена (E23K). Таким образом, в общей сложности были построены 14 стартовых моделей пространственной структуры пептида Тк-hefu2. На рис. 1 в качестве примера изображены две модели, созданные на основе шаблонов Тк-AMP-X2 и Тк-hefu1.

### 1.2. Выбор силового поля

С целью поиска оптимального протокола для расчета МД  $\alpha$ -гарпина Тк-AMP-X2 вычисления были проведены с использованием четырех силовых полей: GROMOS45A3 [8] (силовое поле без явного задания неполярных атомов водорода), AMBER99SB-ILDN [9], CHARMM36-NOV-2014-MOD [10] и AMBER99SBNMR1-ILDN [11] (параметры сведены в табл. 2). Три последних — новые силовые поля, уточненные с помощью данных ЯМР-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа. При выборе силового поля и протокола МД следили за такими показателями как среднеквадратичное отклонение (СКО), число конформационных кластеров (обозначающее гетерогенность конформационного ансамбля), углы скрещивания спиралей и расстояние между заряженными остатками Glu-6 (–) и Lys-18 (+) в ионном мостике. Критерием выбора было наилучшее соответствие структур, полученных в МД, нативному состоянию пептида.

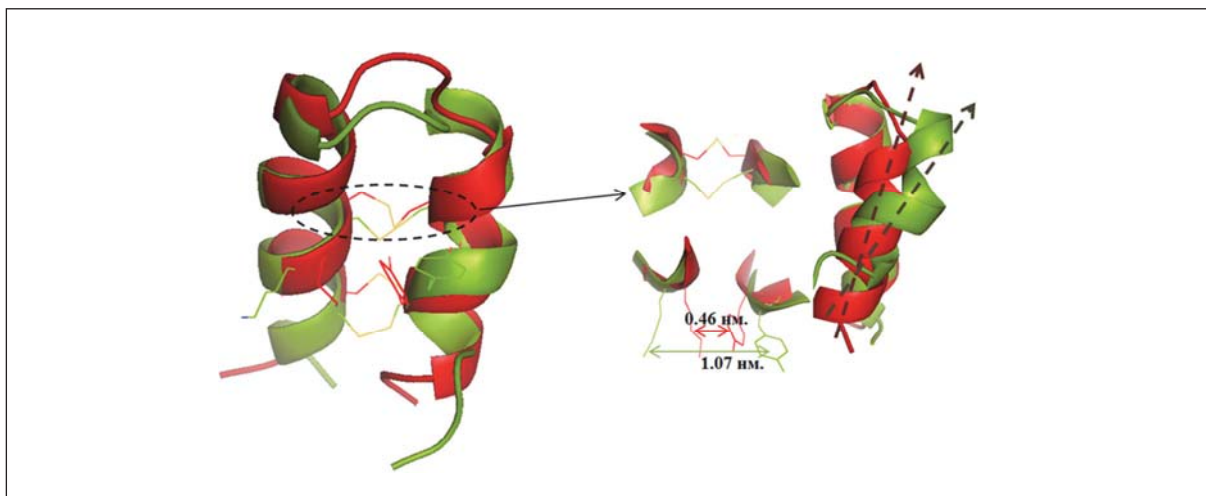


Рис. 1. Пример двух отличающихся стартовых моделей пептида Tk-hefu2. Красным цветом изображен пептид, построенный на основе шаблона Tk-hefu1, зеленым — на основе Tk-AMP-X2. Справа изображены основные параметры, отличающиеся у этих моделей — дисульфидные связи, расстояние между аминокислотными остатками Туг-6 и Lys-22, углы скрещивания спиралей (спирали аппроксимированы векторами, изображенными пунктирными стрелками).

### 1.3. Протокол МД

В результате анализа приведённых выше параметров молекулы Tk-AMP-X2 для дальнейших расчетов было выбрано силовое поле и протокол МД под номером 7 в табл. 2. Алгоритм интегрирования – leap-frog [12], термостатирование осуществляли с помощью алгоритма масштабирования скоростей v-rescale [13], поддержание постоянного давления осуществляли за счет использования алгоритма Берендсена [14]. Все расчеты МД Tk-hefu2 были проведены с помощью программного пакета GROMACS (версии 4.5.2 и 5.0) [15,16].

### 1.4. Методы анализа траекторий МД

Для исследования конформационных возможностей систем и сравнения их с экспериментально полученной структурой пептида были рассчитаны следующие характеристики:

- Средняя величина СКО (среднеквадратичное отклонение) координат атомов каждого МД-конформера от его стартовой структуры. Для расчета использовали утилиту `g_rms` пакета GROMACS. Вычисления проводили по атомам основной цепи  $\alpha$ -спиралей Tk-hefu2 для образующих  $\alpha$ -спирали остатков 5-10 и 14-25.
- Состав и число кластеров всех структур, полученных на основании анализа траектории МД. Расчет выполняли с использованием утилиты `g_cluster` GROMACS, алгоритм `gromos`, по атомам основной цепи  $\alpha$ -спиралей (для остатков 5-10 и 14-25), радиус отсечки при определении кластера составлял 0,2 нм.
- Расстояние между центрами масс заряженных групп боковых цепей остатков Glu-6 (–) и Lys-18 (+) в ионном мостике. Расчет выполняли с использованием утилиты `g_dist` пакета GROMACS.
- Величины двугранных углов  $\chi_1$ ,  $\chi_2$  и  $\chi_3$  дисульфидных связей. Расчет осуществляли с помощью утилиты `gmx gangle` пакета GROMACS.
- Число контактов белок-белок вычисляли с помощью утилиты `g_hbond` программы GROMACS.

Таблица 2. **Параметры расчетов МД**

No	T <sup>1</sup> , нс	V <sup>2</sup> , нм <sup>3</sup>	N <sub>s</sub> /N <sub>mol</sub> <sup>3</sup>	Силовое поле	Модель воды	Coulomb type <sup>4</sup>	dt <sup>5</sup> , фс	n <sup>6</sup>
1	100	Куб (6 <sup>3</sup> )	12242/325	gromos45a3	spc	reaction field	2	6
2	100	Куб (5 <sup>3</sup> )	12387/470	amber99sb-ildn	tip3p	pme	2	5
3	65	Параллел <sup>7</sup> . (4.8×4.3×4.3)	11738/470	amber99sb-ildn	tip4p	pme	2	1
4	7	Параллел. (8.8×8.3×8.4)	80594/470	amber99sb-ildn	tip4p	pme	4	1
5	100	Октаэдр (6.1×5.7×5...)	22242/470	amber99sb-ildn	tip4p	pme	2	3
6	200	Додекаэдр (6.4×6.4×5...)	24476/470	charmm36- nov2014-mod	tip4p	pme	2	4
7	200	Додекаэдр (6.4×6.4×5...)	24476/470	amber99sbn- mr1-ildn	tip4p	pme	2	4

<sup>1</sup> Длительность траектории МД

<sup>2</sup> Форма и размер ячейки

<sup>3</sup> N<sub>s</sub> — число атомов в системе с учетом воды, N<sub>mol</sub> — число атомов в молекуле пептида

<sup>4</sup> Алгоритм учета электростатических взаимодействий

<sup>5</sup> Шаг интегрирования

<sup>6</sup> Число рассчитанных траекторий МД

<sup>7</sup> Параллелепипед

- Углы скрещивания  $\alpha$ -спиралей. Две спирали аппроксимируются двумя направленными векторами  $\vec{r}_1$  и  $\vec{r}_2$ , а угол рассчитывается по формуле  $\cos(\vec{r}_1, \vec{r}_2) = (\vec{r}_1, \vec{r}_2) / (|\vec{r}_1| |\vec{r}_2|)$ . Расчет осуществляли с помощью программы, написанной специально для этого на языке Python.

## 2. Результаты и обсуждение

### 2.1. Влияние различных силовых полей на результат МД

Метод МД дает адекватное и внутренне самосогласованное описание поведения реальных молекулярных систем. Однако данный метод является эмпирическим, поэтому важным является вопрос о соответствии результатов МД экспериментальным данным. В настоящее время значительные усилия направлены на совершенствование применяемых методов моделирования, устранение недостатков и попытки улучшить сходимость результатов, полученных при исследовании молекул с использованием различных силовых полей [17–19]. При выборе силового поля для расчета МД пептида Тк-hefu2 было обнаружено, что для различных силовых полей и других условий компьютерного моделирования динамическое поведение одной и той же молекулы может быть различным. Основным критерием для выбора протокола был расчет по МД-траекториям химических сдвигов для атомов, измеренных в прямом ЯМР-эксперименте. Также различия были проиллюстрированы с помощью таких показателей как величина СКО от начальной структуры, углы скрещивания спиралей, число образующихся конформационных кластеров, расстояние в ионном мостике между остатками Glu-6 и Lys-18.

С помощью дисперсионного статистического анализа было показано, что различия в значениях СКО в семи группах траекторий МД (см. табл. 2) статистически значимы. Наименьшие средние значения наблюдали в 5, 6, 7 группах. Кроме этого, в 6 и 7 груп-

Таблица 3. **Результаты расчета параметров траекторий МД пептида Тк-АМР-Х2. В скобках указаны значения для ЯМР-структуры**

№ <sup>1</sup>	Число кластеров	Среднее СКО	Ионный мостик <sup>2</sup> (0.521 нм)	Угол скрещивания $\alpha$ -спиралей, град. (143°)
1	4	0.201	0.765±0.478	130±3, 152±10
1	2	0.207	1.249±0.139	161±7, -165±4
1	3	0.229	0.983±0.229	112±7, 149±9
1	3	0.234	1.167±0.269	-159±10
1	3	0.250	1.332±0.128	-160±9
1	3	0.205	1.305±0.176	162±7, -166±4
2	8	0.195	0.936±0.335	151±15
3	1	0.192	1.065±0.216	153±8
4	1	0.115	0.775±0.174	153±7
4	3	0.225	1.113±0.238	-164±8
4	4	0.217	0.765±0.286	159±7
5	3	0.199	1.066±0.372	153±10
5	1	0.135	0.547±0.236	139±9
5	6	0.213	0.845±0.457	137±7, 163±6
5	1	0.185	1.033±0.223	153±8
5	1	0.114	0.760±0.203	148±7
6	1	0.168	1.024±0.216	163±4, -166±4
6	1	0.177	1.188±0.164	172±5, -169±6
6	1	0.200	1.124±0.193	164±7
6	1	0.095	1.027±0.165	162±8
7	5	0.177	1.002±0.271	151.8±10, -160±7
7	1	0.198	1.172±0.214	168±7, -157±10
7	1	0.187	1.155±0.156	169.6±5, -166±9
7	1	0.096	0.822±0.178	153±7

<sup>1</sup> Номер группы из табл. 2.

<sup>2</sup> Среднее расстояние между центрами масс заряженных групп Lys-18(+) и Glu-6(-)

пах были зарегистрированы самые низкие значения числа кластеров, что говорит о наиболее высокой стабильности соответствующих структур. Отметим, что на основе сравнительного анализа был сделан вывод о том, что МД Тк-АМР-Х2, рассчитанная с помощью протокола под номером 7 в табл. 2, лучше всего описывает данные, полученные с помощью ЯМР-спектроскопии. Результаты некоторых расчетов представлены в табл. 3.

### *2.2. В водном растворе реализуются два различных состояния одной модели Тк-hefu2*

Методом МД были получены две группы траекторий. Первая группа – Тк-hefu2(Тк-АМР-Х2) – содержит траектории модели Тк-hefu2, полученные на основе структурного шаблона Тк-АМР-Х2. Во второй группе – Тк-hefu2(Тк-hefu1) – при построении стартовых моделей были использованы шаблоны Тк-hefu1. Ожидается, что в результате расчета траекторий МД на равновесных участках траекторий МД заселенности состояний будут примерно одинаковыми в обеих группах, и при этом не будут появляться новые

Таблица 4. **Результат расчета траекторий МД пептида Тк-hefu2, построенного по двум структурным шаблонам. Для траекторий, в которых наблюдали конформационный переход, показаны результаты расчета после перехода**

Шаблон	СКО <sup>1</sup> , нм	$\chi_3$ (9-21/5-25) <sup>2</sup> , град.	Число кластеров	Среднее расстояние Lys-22-Тур-6, нм	Конформационный переход
Тк-АМР-Х2	0.20±0.02	86.6±9 (95.0)/ 75.4±9 (101.1)	5	1.06±0.13	–
Тк-АМР-Х2	0.27±0.06	99.0±10 (96.0)/ 80.1±8 (101.3)	8	0.98±0.16	–
Тк-АМР-Х2	0.15±0.02	92.6±10 (96.9)/ 83.5±8 (100.0)	9	1.02±0.12	–
Тк-АМР-Х2	0.22±0.04	80.1±12 (95.0)/ 84.8±10 (101.1)	11	0.90±0.17	–
Тк-АМР-Х2	0.22±0.03	–73.7±9 (96.9)/ 90.4±10 (100.0)	8	1.03±0.12	–
Тк-АМР-Х2	0.07±0.01	–82.6±9 (–93.8)/ –84.8±8 (–95.9)	2	0.52±0.01	+
Тк-АМР-Х2	0.10±0.02	–86.5±8 (–89.0)/ 97.3±12 (101.3)	3	0.88±0.11	–
Тк-АМР-Х2	0.11±0.01	–87.0±7 (–93.7)/ –83.5±8 (–92.5)	3	0.42±0.09	+
Тк-АМР-Х2	0.09±0.02	–83.7±8 (–93.8)/ –82.3±10 (–95.9)	5	0.67±0.21	+
Тк-АМР-Х2	0.13±0.02	–86.6±7 (–93.7)/ –82.6±8 (–92.5)	1	0.86±0.09	–
Тк-АМР-Х2	0.07±0.02	–81.8±8 (–93.7)/ –84.7±7 (–92.5)	4	0.54±0.05	+
Тк-hefu1	0.07±0.01	–80.7±7 (–86.1)/ –76.4±8 (–80.2)	1	0.45±0.07	–
Тк-hefu1	0.06±0.01	–82.2±7 (–91.3)/ –82.4±7 (–74.4)	1	0.52±0.05	–
Тк-hefu1	0.07±0.01	–80.8±7 (–74.7)/ –77.2±8 (–78.3)	1	0.48±0.07	–
Тк-hefu1	0.08±0.02	–83.1±8 (–68.2)/ –83.4±9 (113.1)	2	0.50±0.07	–

<sup>1</sup> СКО от стартового состояния.

<sup>2</sup> Среднее значение угла  $\chi_3$  для двух дисульфидных связей Cys-9-Cys-21 и Cys-5-Cys-25. В скобках указаны значения углов для начального состояния.

состояния. Таким образом, будет получен представительный конформационный ансамбль системы в равновесном состоянии.

На основании анализа результатов расчетов МД было отмечено, что в группе Тк-hefu2(Тк-hefu1) значения СКО наименьшие (см табл. 4), в то время как структуры в группе Тк-hefu2(Тк-АМР-Х2), хотя и сохраняют тип пространственной укладки полипептидной цепи (т.н. «фолд»), характерный для  $\alpha$ -гарпонинов, но далеко уходят от стартовой модели. В результате расчета значений их СКО от наиболее часто встречающихся структур, полученных из объединенной траектории Тк-hefu2(Тк-hefu1), было обнаружено, что приближение структур из Тк-hefu2(Тк-АМР-Х2) к структурам из Тк-hefu2(Тк-hefu1) происходит в четырех случаях из десяти (рис. 2), то есть наблюдается конформационная гетерогенность семейства моделей Тк-hefu2(Тк-АМР-Х2). Структурные различия описывали с помощью таких характеристик как расстояние в функционально важной диаде Тур-6-Lys-22, число контактов белок-белок, угол скрещивания спиралей. Обнаружено, что в момент «приближения» МД-конформаций к модели Тк-hefu1 происходит поворот спирали 5-10, который регулирует расстояние в диаде Тур-6-Lys-22, за счет чего увеличивается число контактов белок-белок (рис. 3), то есть происходит конформационный переход.

Таким образом, выявлены два структурно-различных состояния модели Тк-hefu2. Установлены ключевые параметры, определяющие различия в этих структурах. Для четырех траекторий МД Тк-hefu2(Тк-АМР-Х2), в которых наблюдали конформационный переход, был описан механизм переключения, реализующийся одинаково во всех четырех случаях, из чего следует, что событие не является случайным.

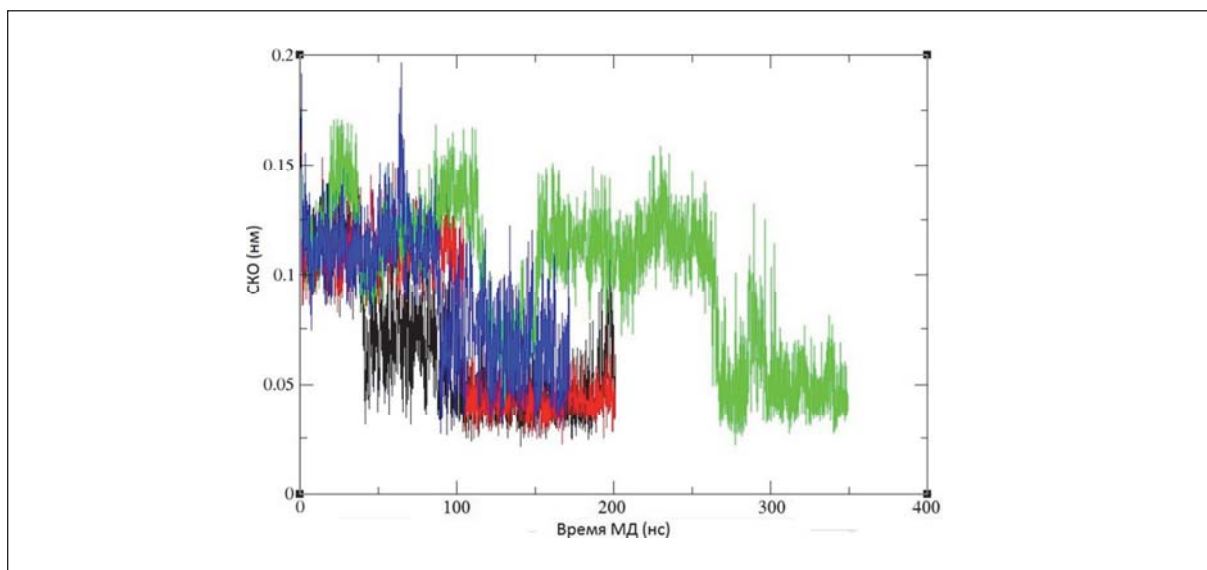


Рис. 2. Зависимость величины СКО от времени МД для четырех траекторий МД пептида Тк-hefu2(Тк-АМР-Х2) от наиболее часто встречающегося состояния в траекториях Тк-hefu2(Тк-hefu1). С течением времени величина СКО уменьшается, а, значит, эти четыре модели Тк-hefu2(Тк-АМР-Х2) в динамике начинают «приближаться» к моделям Тк-hefu2(Тк-hefu1).

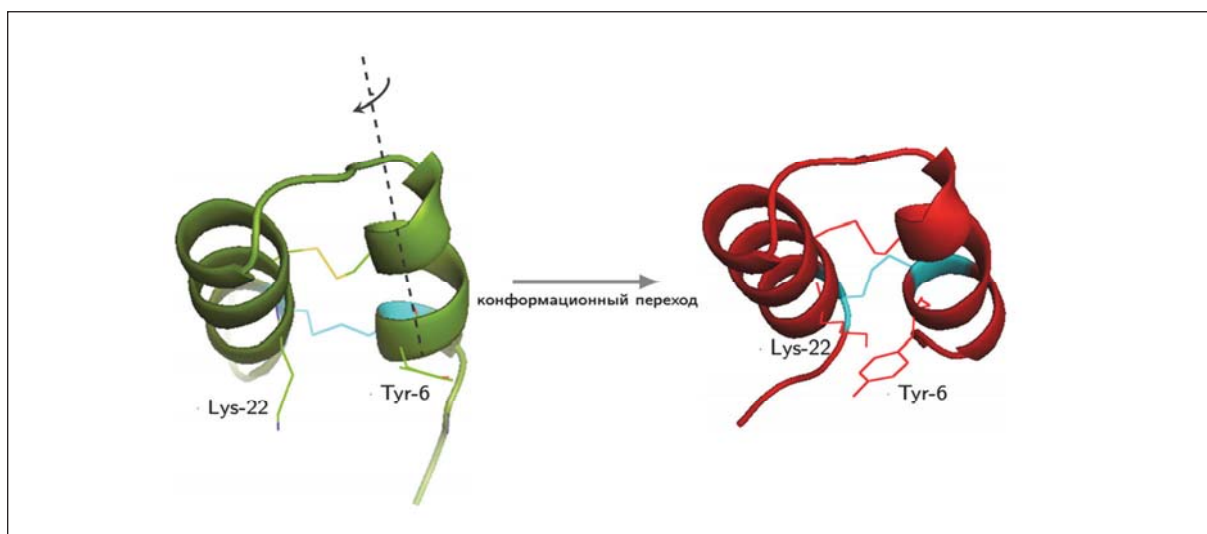


Рис. 3. Конформационный переход, наблюдаемый в молекуле Тк-hefu2 в ходе МД в воде. Слева изображена молекула Тк-hefu2 до перестройки, справа — после приближения к структуре, близкой к Тк-hefu1. Голубым цветом выделены дисульфидные связи, которые меняют конфигурацию в момент перестройки. Обозначены остатки Lys-22 и Tyr-6, которые после перестройки заметно сближаются, за счет чего увеличивается число контактов белок-белок.

Также обнаружены различия в динамическом поведении моделей Тк-hefu2(Тк-АМР-Х2) в зависимости от угла  $\chi_3$  в дисульфидной связи Cys-9-Cys-21. Пептид с отрицательным значением угла в исходной конформации ведет себя более стабильно, что видно по числу кластеров и средней величине СКО от стартовой модели. Кроме того, конформационный переход наблюдается только в траекториях Тк-hefu2(Тк-АМР-Х2) с отрицательными значениями угла  $\chi_3$  в двух дисульфидных связях. Данное наблюдение важно, поскольку в ЯМР-структурах Тк-АМР-Х2 есть как отрицательные, так и поло-



жительные значения углов  $\chi_3$  в равных пропорциях, поскольку лишь на основании экспериментальных ЯМР-данных точное значение углов  $\chi_3$  определить не удастся. Поэтому, если бы для моделирования были выбраны структуры только с положительными величинами углов, переходов могло не произойти, а, значит, не была бы найдена единая конформация при старте МД с разных шаблонов. Отсюда можно сделать вывод для дальнейших исследований – при построении стартовых структур  $\alpha$ -гарпонинов (и, видимо, других полипептидов со сходной организацией дисульфидных связей) нужно обращать внимание на гетерогенность структур, полученных в эксперименте, а именно на конфигурации дисульфидных связей, и для расчетов использовать различные варианты.

### *2.3. Лишь одно из наблюдаемых в ходе МД в воде состояний Тк-hefu2 потенциально активно в блокировании $K^+$ -канала Kv1.3*

Как указано выше, расчеты МД в воде позволили выявить два конформационных состояния пептида Тк-hefu2, одно из которых ближе к антимикробному пептиду (АМП) Тк-АМР-Х2, а второе – к блокатору калиевого канала Kv1.3 Тк-hefu1. Предположительно, между этими двумя состояниями в растворе существует динамическое равновесие, которое существенно смещается в сторону одной из конформаций в случае аминокислотных замен в «горячих точках», меняющих пептид структурно и функционально в направлении АМП или блокатора канала. Мы провели анализ пространственного и физико-химического соответствия каждой из этих конформаций мишени действия пептида Тк-hefu2 – каналу Kv1.3, – смоделировав возможную пространственную структуру комплекса Тк-hefu2—Kv1.3 на основе экспериментально определенной модели комплекса харибдотоксина с близким каналом (Kv1.2-2.1) [20]. Выбранная методика сравнения, основанная на применении метода «белковой топографии» [21], позволяет «картировать» поверхности взаимодействующих биомолекул и количественно оценить степень их соответствия друг другу.

Результаты сравнения (данные не приведены и готовятся к отдельной публикации) показали, что именно состояние Тк-hefu2, близкое к конформации пептида-блокатора Тк-hefu1, хорошо соответствует структуре  $K^+$ -канала, позволяя выдвинуть гипотезу, что лишь одно из двух найденных конформационных состояний соответствует биологически-активной структуре данного пептида.

### **3. Заключение**

В результате проделанной работы методами компьютерного моделирования были предложены две модели пространственной структуры пептида Тк-hefu2 и исследованы возможности метода МД для небольших и сравнительно жестких пептидов, таких как  $\alpha$ -гарпинины. Показано, что метод МД не всегда позволяет эффективно исследовать конфигурационное пространство макромолекул, даже таких небольших и конформационно-ограниченных. Одна из очевидных рекомендаций – не ограничиваться в расчетах единственной МД-траекторией, но накапливать больше статистики, производя несколько независимых стартов с различающихся конформационных состояний одной и той же молекулы.

Было показано, что разные силовые поля и параметры протокола МД даже для такой простой (с точки зрения биолога) системы, как  $\alpha$ -гарпинины, работают по-разному. В результате расчетов был выбран протокол, который хорошо описывает экспериментальные данные (химические сдвиги из ЯМР-экспериментов).

Жесткость пространственной структуры  $\alpha$ -гарпонинов объясняется наличием в ней двух дисульфидных связей, которые крепко удерживают две спирали. Именно поэтому осуществлять переход из одного состояния в другое для такой молекулы достаточно сложно (по крайней мере, такие события довольно редко наблюдаются в МД). В данной

работе было показано, что переходы к структуре, близкой к Tk-hefu1, осуществлялись только в случае отрицательных значений углов  $\chi_3$  в обеих дисульфидных связях (около  $-90^\circ$ ) и не наблюдались в случае положительных углов  $\chi_3$  (около  $+90^\circ$ ) хотя бы в одной дисульфидной связи. Поэтому, чтобы понизить вероятность неполного анализа конформационного фазового пространства пептида в воде, в расчетах следует использовать наиболее полную выборку из экспериментальных данных, а именно структуры с различными значениями углов  $\chi_3$  в дисульфидных связях.

Наконец, детальный анализ модели комплекса Tk-hefu2 с  $K^+$ -каналом показал, что только в одной из полученных наиболее заселенных конформаций взаимодействие с белком-мишенью может быть выгодным. Это свидетельствует о том, что даже небольшие структурные отличия в пептидах могут быть критически важными для проявления пептидами семейства  $\alpha$ -гарпининов биологической активности.

### Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 14-24-00118), гранта Президента РФ (№ МК-6310.2015.4) и Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология». Мы благодарим Светлану Нольде за помощь в сопоставлении данных МД и спектроскопии ЯМР и выборе оптимального силового поля, а также Александра Василевского за обсуждение результатов. Л.А.Ф. выражает благодарность Программе фундаментальных исследований НИУ ВШЭ за поддержку. Часть расчетов МД проводили с использованием вычислительных ресурсов Суперкомпьютерного центра «Политехнический» СПбГТУ.

### Литература

1. Berkut A. A., Usmanova D. R., Peigneur S., Oparin P. B., Mineev K. S., Odintsova T.I., Tytgat J., Arseniev A. S., Grishin E. V., and Vassilevski A.A. "Structural Similarity between Defense Peptide from Wheat and Scorpion Neurotoxin Permits Rational Functional Design." *J. Biol. Chem.* 289(20), 14331-14340, 2014
2. Oparin P. B., Mineev K. S., Dunaevsky Y. E., Arseniev A. S., Belozersky M. A., Grishin E. V., Egorov T. A., and Vassilevski A. A. "Buckwheat trypsin inhibitor with helical hairpin structure belongs to a new family of plant defence peptides." *Biochem. J.* 446, 69–77, 2012.
3. Nolde S. B., Vassilevski A. A., Rogozhin E. A., Barinov N. A., Balashova T. A., Samsonova O.V., Baranov Y. V., Feofanov A. V., Egorov T. A., Arseniev A. S., and Grishin E. V. "Disulfidestabilized helical hairpin structure and activity of a novel antifungal peptide EcAMP1 from seeds of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*)." *J. Biol. Chem.* 286, 25145–25153, 2011.
4. Conners R., Konarev A. V., Forsyth J., Lovegrove A., Marsh J., Joseph-Horne T., Shewry P., and Brady R. L. "An unusual helix-turn-helix protease inhibitory motif in a novel trypsin inhibitor from seeds of *Veronica (Veronica hederifolia L.)*." *J. Biol. Chem.* 282, 27760-27768, 2007.
5. Srinivasan K. N., Sivaraja V., Huys I., Sasaki T., Cheng B., Kumar T. K., Sato K., Tytgat J., Yu C., San B. C., Ranganathan S., Bowie H.J., Kini R. M., and Gopalakrishnakone P. " $\kappa$ -hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity." *J. Biol. Chem.* 277, 30040-30047, 2002.
6. Nirathanan S., Pil J., Abdel-Mottaleb Y., Sugahara Y., Gopalakrishnakone P., Joseph J. S., Sato K., and Tytgat J. "Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to  $\kappa$ -KTx1.3, a non-toxic homologue of  $\kappa$ -hefutoxin-1, from *Heterometrus sprinifer* venom." *Biochem. Pharmacol.* 69, 669-678, 2004.
7. DeLano W. L. "The PyMol Molecular Graphics System.", <http://www.pymol.org>, 2002.
8. Schuler L. D., Daura X., and Van Gunsteren W. F. "An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase." *J. Comput. Chem.* 22, 1205-1218, 2001.
9. Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J. L., Dror R. O., and Shaw D. E. "Improved Side-Chain Torsion Potentials For The Amberff99SB Protein Force Field." *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 78, 1950-1958, 2010.
10. Best R. B., Zhu X., Shim J., Lopes P. E. M., Mittal J., Feig M., and MacKerell A. D. "Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone

- $\varphi$ ,  $\psi$  and Side-Chain  $\chi_1$  and  $\chi_2$  Dihedral Angles." *Journal of Chemical Theory and Computation*. 8(9), 3257-3273, 2012.
11. Daura X., Gademann K., Jaun B., Seebach D., van Gunsteren W. F., and Mark A. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 236-240, 1999.
  12. Hockney R. W., Goel S. P., Eastwood J. "Quiet High Resolution Computer Models of a Plasma." *J. Comp. Phys.* 14, 148-158, 1974.
  13. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. "Canonical sampling through velocity rescaling." *J. Chem. Phys.* 126, 014101, 2007.
  14. Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., DiNola A., Haak J. R. "Molecular dynamics with coupling to an external bath." *J. Chem. Phys.* 81, 3684–3690, 1984.
  15. Pronk S., Páll S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J.C., Kasson P.M., Van der Spoel D., Hess B., Lindahl E. "GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit." *Bioinformatics*. 29, 845–854, 2013.
  16. Abraham M. J., Van der Spoel D., Lindahl E., Hess B. "GROMACS user manual version 5.0.4." [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org), 2014.
  17. Van Gunsteren W.F., Bakowies D., Baron R. "Biomolecular modeling: goals, problems, perspectives." *Angewandte Chemie International Edition*. 45, 4064–4092, 2006.
  18. Feig M., MacKerell A., Brooks C. "Force field influence on the observation of  $\pi$ -helical protein structures in molecular dynamics simulations." *Journal of Computational Chemistry*. 107, 2831-2836, 2003.
  19. Hornak V., Abel R., Okur A. "Comparison of multiple AMBER force fields and development of improved protein backbone parameters." *Proteins*. 65, 712- 725, 2006.
  20. Banerjee A., Lee A., Campbell E., and Mackinnon R. "Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K(+) channel". *Elife Sciences*. e00594, 2013.
  21. Koromyslova A. D., Chugunov A. O., and Efremov R. G. "Deciphering Fine Molecular Details of Proteins' Structure and Function with a Protein Surface Topography (PST) Method." *Chemical information and Modeling*. 54(4), 1189–1199, 2014.

# STRUCTURE AND DYNAMICS OF $\alpha$ -HAIRPININ PEPTIDE Tk-hefu2 IN WATER: COMPUTER SIMULATIONS

Lihonosova A.F.<sup>1,2</sup>, Chugunov A.O.<sup>2</sup>, Efremov R.G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*National Research University HSE*  
<sup>2</sup>*IBCh RAS*

alihonosova@gmail.com

Received 19.08.2016

$\alpha$ -Hairpinin peptides is the novel family of defense peptides that adopt a common fold – two  $\alpha$ -helices stabilised by two disulphide bonds – carrying out a variety of functions. Theoretically, universal  $\alpha$ -hairpinin scaffold could be used for rational design and further construction of novel molecules with desired biological functions. In this research, we explored the dynamics of the model of bioengineered  $\alpha$ -hairpinin peptide Tk-hefu2, which spatial structure is unsolved. Computer modelling reveals two major conformational states of Tk-hefu2 in water. Structural and dynamic parameters are described. Further analysis identifies one of the states as probably functionally active, exhibiting potassium channel blocking activity. This result provides basis for understanding the quantitative structure–function relationships of  $\alpha$ -hairpinins and therefore for the rational design of novel blockers/modulators of voltage-gated potassium channels.