=== БИОИНФОРМАТИКА ====

УДК: 51-76, 519.252

Эргономичный способ оптимизации первичной структуры пептидного лиганда

Данилкович А.В.^{1,2}, Тихонов Д.А.^{3,4}, Туробов В.И.¹, Удовиченко И.П.^{1,2}

¹Филиал института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

²Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия ³Институт математических проблем биологии РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша

РАН, Пущино, Россия

⁴Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Аннотация. Для поиска энергетически выгодных вариантов структуры пептидного лиганда, образующего комплекс с белками главного комплекса гистосовместимости и Т-клеточным рецептором (SwissProt ID: 2Z31), проведено сравнение энергии связывания гексамеров, являющихся фрагментами структуры нативного лиганда. Для формирования набора исследуемых гексамеров использовался метод Тагучи. Всего было построено 53 варианта структуры комплекса, которые исследовались с использованием метода молекулярной динамики. Расчеты были проведены как для полных комплексов, так и для свободных структур – рецепторов и лигандов. На основании полученных молекулярных траекторий, с использованием обобщенного метода Борна, рассчитывались и усреднялись величины свободной энергии структур. Использование метода Тагучи для анализа последовательности пептидного гексамера позволило определить прототипы лиганда, структуры которых имеют более высокую энергию связывания с рецептором по сравнению с фрагментом исходного лиганда SQYRPS. Примененный подход существенно сократил время эксперимента, требуемое для успешной оптимизации первичной структуры пептидного лиганда.

Ключевые слова: метод Тагучи, оптимизация структуры, энергия Гиббса, пространственная модель, молекулярная динамика.

введение

Решение практических вопросов, относящихся к задачам сравнительного анализа эффективности биологических макромолекул повышения И процесса комплексообразования, предполагает, в частности, необходимость направленного изменения свойств лиганда, что требуется в процессе разработки новых лекарств на основе пептидов. В ходе сравнения важных термодинамических характеристик изучаемого объекта традиционно принято оценивать свободную энергию растворения в воде, поэтому важно использовать адекватные методы оценки энергии Гиббса изучаемых структур. Задача модификации структур биологически активных молекул с целью улучшения их свойств является естественным фактором существования современной фарминдустрии. В этой связи – поиск и улучшение топологической совместимости молекулярных структур типа лиганд – рецептор относятся к первоочередным задачам современной науки.

Существует стандартный подход к решению конкретных задач по оптимизации

структуры, известный как «метод проб и ошибок» или «простой перебор». Несмотря на ясность применения, данный метод не может считаться практичным при анализе систем, характеризующихся многими параметрами, поскольку его реализация предполагает сравнение свойств очень большого количества изделий – прототипов.

В частности, для анализа пептида, состоящего из N аминокислотных остатков, структура которого вырождена в каждой позиции m раз, потребуется изучить N^m различных полипептидных последовательностей. Очевидно, что для анализа гексамера, сформированного аминокислотными остатками пяти типов было бы необходимо рассмотреть 5^6 вариантов структуры пептида. Нет необходимости доказывать трудность выполнения такой работы, учитывая не только временной фактор – количество экспериментов, которые необходимо осуществить, но и затраты на их реализацию.

Для решения указанной проблемы применительно к пептидным структурам нами было предложено использовать метод, основанный на подходе, использующем для планирования эксперимента ортогональное множество, известное также как матрица Тагучи [1]. Ортогональная матрица позволяет минимизировать объём анализируемой учитывать выборки И эффективно взаимное влияние элементов матрицы, в разных расположенных столбцах, а это, применительно к пептидным последовательностям, сокращает время поиска новых структур [2]. Данное обстоятельство, зачастую, имеет решающее значение, учитывая временные и ресурсные затраты для выполнения работ по созданию новых биологически активных молекул. В технических областях метод Тагучи позволяет радикально интенсифицировать процесс разработки и оптимизации характеристик ключевых параметров изделия, что обеспечивает контроль над основными свойствами объекта, начиная со стадии проектирования. Таким образом, главным следствием применения метода Тагучи является сокращение времени, требующегося для создания объекта с необходимыми свойствами за счёт оптимизации процесса проектирования [3]. Другими словами, научного планирования эксперимента современный уровень подразумевает возможность направленного изменения суммы качественных характеристик объекта с последующей оценкой его количественных параметров, что ускоряет процедуру создания нового продукта или изделия. Целью использования данного подхода является получение набора требуемых свойств или качеств продукта. Это достигается путём исполнения специфических функций на стадии планирования совокупности качественных показателей прототипа изделия. На завершающем этапе работ, после контроля базовых свойств и сравнительного анализа характерных параметров возможно принятие итоговых решений о прототипе продукта на основании полученных данных о свойствах модели.

Использование метода Тагучи в молекулярной биологии для анализа биологически активных молекул крайне ограничено, хотя существуют предварительные данные о применимости метода для оптимизации полимеразной цепной реакции [4], выработки технологических рекомендаций по использованию экспрессирующих систем для получения рекомбинантных продуктов [5] и оптимизации диагностических систем in vitro [6]. Авторы попытались восполнить данный пробел тем, что в данной работе поставили перед собой задачу – изучить применимость метода Тагучи для оптимизации структуры пептидного лиганда, представленного в виде гексамера. В качестве модели для изучения применимости такого подхода нами был выбран фрагмент лиганда в составе сложного комплекса – молекулы главного комплекса гистосовместимости (MHC-II) и Т-клеточного рецептора (TCR) (SwissProt ID: 2Z31). Данный комплекс является характерным образованием на поверхности Т-лимфоцитов, функции которых важны для основных этапов развития и регуляции иммунного ответа в организме. Поскольку комплексы структур ТСЯ и МНС-ІІ задействованы также при аутоиммунных реакциях, представляется важной задача продуктивного дизайна аналогов структур лиганда основного белка миелина, в составе комплекса типа 2Z31, для получения антагонистов Т-клеточных эпитопов, стимулирующих развитие аутоиммунных заболеваний, в частности – рассеянного склероза (PC) [7].

В предыдущей работе, посвященной поиску альтернативных структур пептидов в составе комплекса, в качестве основного критерия использовалась величина наименьшей молекулярно-механической энергии комплекса (ММЕ). Прототипы структур лиганда выбирались с использованием метода Тагучи и ортогональной матрицы L25 [2]. Выбор молекулярно-механической энергии в качестве целевой функции при поиске минимального по энергии связывания пептида имеет чисто теоретический интерес, поскольку ММЕ не учитывает влияние водного окружения. Все эти вопросы учитывались авторами при выполнении данной работы.

В первой части статьи рассматривается способ использования матрицы Тагучи L25 для формирования списка аминокислотных последовательностей прототипов лиганда. Выбор в качестве объекта исследования пептидного лиганда позволяет исследовать влияние различных аминокислотных остатков на характеристики комплекса TCR/MHCконструирования лиганда, II [7], применяя метод Тагучи для содержащего определенный набор аминокислотных остатков. В основной части работы приведено сравнение средних (по молекулярной траектории) величин энергии связывания, вычисленных для различных структур лиганда, и приводятся аргументы в пользу выбора того или иного аминокислотного остатка для заполнения соответствующей позиции в первичной структуре прототипа лиганда. В заключении приведены основные выводы по результатам работы и указаны особенности реализации метода Тагучи для изменения пептидного лиганда.

В качестве целевой функции сравнения факторов в данной работе использовалась величина энергии связывания ΔE , вычисленная с использованием обобщенного метода Борна (MM/GBSA) для учета эффекта сольватации на основании учета площади поверхности структуры, контактирующей с растворителем [8]:

$$E = E_{\rm MM/GBSA} = E_{\rm MM} + E_{\rm GB} + \gamma A_{\rm SA} \tag{1}$$

где $E_{\rm MM}$ – молекулярно-механическая энергия, включающая в себя все механические, электростатические и Ван-дер-Ваальсовые взаимодействия; $E_{\rm GB}$ – обобщенная энергия Борна, которая учитывает влияние растворителя на свободную энергию молекулы; $\gamma A_{\rm SA}$ – вклад в свободную энергию, пропорциональный площади поверхности молекулы $A_{\rm SA}$ [8].

Сравнивались значения свободной энергии для каждой изучаемой структуры, и определялась степень влияния каждого аминокислотного остатка из исследуемой выборки аминокислот {S, Q, Y, R, P} на термодинамические характеристики комплекса, выраженные как величина энергии связывания прототипа лиганда. Поскольку априори не было известно, как меняется геометрия рецептора в процессе взаимодействия с тем или иным лигандом, величина энергии связывания рассчитывалась на основании молекулярно-динамических траекторий двумя альтернативными способами: как разница значений энергии полного комплекса $E^{\text{комп}}$ и энергий рецептора $E^{\text{рец}}$ с лигандом $E^{\text{лиг}}$ в свободном виде (2); и варианта, при котором из энергии полного комплекса вычитали среднюю величину свободной энергии $\overline{E}^{\text{рец}}$ всех изученных в данной работе структур изолированного рецептора (3):

$$\Delta E = E^{\text{комп}} - E^{\text{рец}} - E^{\text{лиг}}, \qquad (2)$$

$$\Delta \overline{E} = E^{\text{комп}} - \overline{E}^{\text{рец}} - E^{\text{лиг}}.$$
(3)

Использование двух способов расчёта величины свободной энергии для каждого фактора, имитирующего одну из шести позиций первичной структуры пептидного

лиганда, определило получение двух прототипов структур лигандов. В результате исследования их термодинамических свойств методом молекулярной динамики найдено, что предсказанные структуры пептидных гексамеров в составе комплекса характеризуются более низкими значениями энергии связывания с белками рецепторов в сравнении с оптимизируемым лигандом.

Таким образом, в результате работы подтверждена применимость метода Тагучи для создания структур новых лигандов. Предложенная методология разработки биологически активных молекул олигопептидов может найти своё применение как продуктивный подход в современной индустрии для создания лекарств на пептидной основе.

методы

1. Выбор объекта и модельные пептиды

Поскольку матрица Тагучи L25 позволяет анализировать гексамер с пятью степенями свободы по каждому положению было решено определить участок структуры пептидного лиганда H-RGGASQYRPSQ-ОН в составе комплекса белков главного комплекса гистосовместимости и Т-клеточного рецептора (SwissProt ID: 2Z31). Структура лиганда была разбита на перекрывающиеся участки – гексамеры с шагом 1, начиная с *N*-конца. Для полученных шести структур (рис. 1) создали пространственные модели с использованием пакета программ SPDB viewer [9], а затем разместили их в качестве прототипов лиганда в составе комплекса с белками рецепторов, аналогично структуре комплекса 2Z31. Термодинамические характеристики созданных структур исследовали методом молекулярной динамики (МД). В результате сравнительного анализа энергии связывания, для оптимизации характеристик был выбран фрагмент структуры с последовательностью H-SQYRPS-ОН, который характеризуется наименьшей энергией связывания (рис. 1).



Рис. 1. Энергия связывания $-\Delta E$ гексапептидов, представляющих различные фрагменты структуры нативного лиганда RGGASQYRPSQ; по результатам экспериментов с использованием молекулярной динамики. Синим цветом обозначены результаты использования модели сольватации Hawkins, Cramer, Truhlar (HCT) [10]; желтым обозначены результаты использования модели сольватации Onufriev, Bashford, Case (OBC) с параметрами $\alpha = 0.8$, $\beta = 0.0$ и $\gamma = 2.909$ [11].

На первом этапе эксперимента по оптимизации структуры гексапептида в составе сложного комплекса с использованием метода Тагучи, были определены необходимые последовательности 25 гексамеров – лигандов. Для этой цели использовалась ортогональная матрица OA(25, 6, 5, 2, 1), или матрица Тагучи L25 [2]. Применение матрицы Тагучи для оптимизации пептидного лиганда подразумевает, что элементы

ДАНИЛКОВИЧ и др.

матрицы обозначают определённый аминокислотный остаток из выборки {S,Q,Y,R,P} для каждой позиции в первичной структуре лиганда. Таким образом, были определены структуры, необходимые для первичного анализа последовательностей лигандов (табл. 1).

Таблица 1. Ортогональная матрица Тагучи L25, которая использовалась для формирования списка гексапептидов*

N⁰	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4	Фактор 5	Фактор 6
1	2	4	5	1	2	3
2	3	2	4	1	3	5
3	5	5	4	3	2	1
4	3	3	5	2	4	1
5	4	5	3	1	4	2
6	3	1	3	5	2	4
7	2	3	4	5	1	2
8	4	3	1	4	2	5
9	1	1	1	1	1	1
10	5	1	5	4	3	2
11	1	2	2	2	2	2
12	1	3	3	3	3	3
13	3	5	2	4	1	3
14	1	5	5	5	5	5
15	2	5	1	2	3	4
16	4	2	5	3	1	4
17	1	4	4	4	4	4
18	5	2	1	5	4	3
19	4	4	2	5	3	1
20	3	4	1	3	5	2
21	5	3	2	1	5	4
22	2	2	3	4	5	1
23	5	4	3	2	1	5
24	4	1	4	2	5	3
25	2	1	2	3	4	5

*для оптимизации первичной структуры лиганда в составе комплекса 2Z31 выбран участок последовательности лиганда SQYRPS, состоящий из 5 видов аминокислотных остатков $\{S,Q,Y,R,P\}$ так, что S = 1, Q = 2, Y = 3, R = 4, P = 5.



Рис. 2. Структура комплекса 2Z31 модифищирована за счёт удаления С-концевых фрагментов двух субъединиц МНС-II (МНС-IIα Δ81-180 и МНС-IIβ Δ82-190). А – места усечения структуры комплекса обозначены красными стрелками; Б – модифицированная структура комплекса, использованная для молекулярной динамики.

Для указанных последовательностей гексамеров пептидов были созданы 3-D модели, которые использовались для молекулярного докинга и размещения в качестве лиганда в составе комплекса с белками Т-клеточного рецептора (TCR) и главного комплекса гистосовместимости (MHC-II), как они представлены в структуре 2Z31. Структура комплекса 2Z31 была модифицирована за счёт удаления С-концевых фрагментов двух субъединиц MHC-II (MHC-IIα Δ81-180 и MHC-IIβ Δ82-190) (рис. 2).

2. Подготовка проб

Состояние протонирования заряженных аминокислотных остатков было выбрано соответствующим значению pH равного 7. Все модельные структуры были оптимизированы в составе комплекса в вакууме с использованием параметрического силового поля GROMOS96 43B [12] Файлы координат атомов в формате PDB, соответствующие полученным моделям, были использованы в качестве начальных данных для осуществления термодинамических расчётов и проведения молекулярно-динамических экспериментов.

3. Молекулярная динамика

Моделирование молекулярной динамики комплекса белков и лиганда, а также последующий анализ результатов осуществлялся с использованием пакета программ Amber16 [13]. Моделирование динамики комплексов проводилось с учетом неявного водного окружения с использованием силового поля AMBER ff03 [14]. В результате использования протокола, аналогичного использованному ранее [15], были рассчитаны 159 молекулярных траекторий для экспериментальных структур лиганда в составе комплекса, для белков-рецепторов и свободных лигандов. Сначала была осуществлена минимизация энергии системы при фиксированном положении координат атомов полипептидов, чтобы упорядочить атомарные взаимодействия. Затем, в течение 10 пс был выполнен небольшой разогрев до 300 К и две последовательные стадии минимизации энергии модели с частичным ослаблением сил, фиксирующих положения атомов объекта в пространстве. На следующем этапе вся система без ограничений была разогрета до температуры 300 К в течение 10 пс. В результате выполнения перечисленных операций система приводилась к состоянию с желаемыми параметрами, затем рассчитывалась молекулярно-динамическая для которого траектория продолжительностью 0.6 нс для каждого варианта структуры. Расчеты проводились на кластере К-60 Института прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН.

4. Анализ экспериментальных структур

Обработка данных, представленных в таблице 2, позволяет вычислить средние величины значений факторов по каждому аминокислотному остатку, а затем сравнить предпочтительность размещения того или иного аминокислотного остатка в определённом положении гексамера, основываясь на наименьшей величине разницы энергий комплекса и свободных компонентов (табл. 3), либо на разнице величин энергий комплекса, средней энергии рецептора и энергии свободного лиганда (табл. 4). Данный подход предполагает возможность выбора лучших аминокислотных остатков для каждой позиции гексамера, что позволяет получить вероятную первичную структуру лиганда с подходящими термодинамическими характеристиками.

5. Энергия связывания лиганда

Свободная энергия, связанная с зарядами, считается пропорциональной электростатическому потенциалу молекулы, и может вычисляться с помощью аппроксимации решения линеаризованного варианта уравнения Пуассона–Больцмана

ДАНИЛКОВИЧ и др.

(PB – Poisson–Boltzmann) – полуаналитической функции, известной как обобщенный метод Борна (GB – Generalized Born). Полная энергия Гиббса равна сумме молекулярномеханической энергии молекулы (MM – Molecular mechanics) и взаимодействий с окружающей средой. Для анализа термодинамики выполнена оценка энергии Гиббса для каждой сохраненной мгновенной геометрии комплексов полипептидов с использованием MM/GBSA [8, 16, 17], учитывая молекулярно-механическую (MM) энергию и избыточный химический потенциал, оценка которого осуществлена с применением двух вариантов обобщенного метода Борна (GB) для определения термодинамического эффекта сольватации модели с использованием параметров программы Amber16 [13], где параметр gb=1 соответствует подходу, предложенному Hawkins, Cramer, Truhlar (HCT) [10], gb = 2 – подходу, предложенному Onufriev, Bashford, Case (OBC), с величинами $\alpha = 0.8$, $\beta = 0.0$ и $\gamma = 2.909$ [11]). При изучении гексамеров, полученных диссекцией структуры нативного лиганда в комплексе 2Z31, оба способа продемонстрировали сравнимые результаты (рис. 1), поэтому в дальнейшем мы использовали параметр gb = 1.

Результаты сравнивались с использованием среднего значения энергии Гиббса, полученного обобщенным методом Борна по каждой молекулярно-динамической траектории экспериментального объекта. Энергия связывания лиганда $-\Delta E$ рассчитывалась из разницы энергий полного комплекса и рецептора с лигандом в свободном виде (2). Альтернативно использовалась энергия связывания $-\Delta \overline{E}$, полученная из (3), где учитывается средняя величина свободной энергии рецептора для всех молекулярно-динамических траекторий, рассчитанных в работе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Применение двух способов расчёта свободной энергии

Представление элементов матрицы Тагучи в виде аминокислотных остатков из выборки {S,Q,Y,R,P} согласно схеме, приведённой в таблице 1, позволило сформировать 25 последовательностей гексамеров, которые в виде моделей лигандов использовали для построения соответствующих комплексов и дальнейшего изучения с использованием метода молекулярной динамики. Величины свободной энергии компонентов комплексов и вычисленные энергии связывания лигандов, представлены в таблице 2, как усреднённые по молекулярно-динамическим траекториям соответствующих структур.

При анализе термодинамических характеристик 25 гексамеров, полученных с использованием матрицы Тагучи (табл. 2), в составе комплекса, можно выделить двенадцать последовательностей, характеризующихся величиной энергии связывания в составе комплекса выше мелианы ($-\Delta E^{MER} = 54.80$ (ккал/моль)). Для сравнения – аналогичный параметр для контрольного гексамера, являющегося фрагментом нативного лиганда и имеющего последовательность SQYRPS, составляет величину - $-\Delta E = 24.31$ (ккал/моль). В результате использования альтернативного способа вычисления величины энергии связывания $\Delta \overline{E} = E^{\text{комп}} - \overline{E}^{\text{рец}} - E^{\text{лиг}}$ удаётся определить всего три структуры прототипов лиганда, для которых величина энергии связывания медианного значения $-\Delta E^{\text{мед}} = 48.34$ соответствующего (ккал/моль) выше И контрольного лиганда $-\Delta \overline{E} = 53.81$ (ккал/моль), хотя 9 структур имеют величину энергии связывания выше, чем медиана.

Из данных, приведённых в таблице 2 следует, что два способа вычисления величины энергии связывания лиганда обеспечивают различный результат в плане конструирования прототипов структур, поэтому было решено рассматривать оба метода вычисления величины энергии связывания $-\Delta E$ и $-\Delta \overline{E}$ как альтернативные способы оценки характеристик изучаемых структур и использовать их в работе параллельно для

последующего сравнения их эффективности.

Таблица 2. Величины свободной энергии комплекса, рецептора и лиганда ($E^{\text{комп}}$, $E^{\text{рец}}$, $E^{\text{лиг}}$), и энергии связывания ($-\Delta E$ и $-\Delta \overline{E}$) для каждой экспериментальной структуры, полученной с использованием ортогональной матрицы Тагучи L25. Для энергий связывания приведены доверительные интервалы D_{α} для уровня значимости $\alpha = 0.05$.

N₂	лиганд	$E^{ ext{komin}}$	$E^{ m peu}$	$E^{\scriptscriptstyle ли m r}$	$-\Delta E$	D_{lpha}	$-\Delta \overline{E}$	D_{lpha}
1	QRPSQY	-8876.70	-8515.70	-294.96	66.06	11.23	18.28	6.70
2	YQRSYP	-8882.80	-8576.20	-270.51	36.09	12.59	48.85	7.35
3	PPRYQS	-8848.00	-8525.20	-222.13	100.64	13.23	62.40	9.32
4	YYPQRS	-8843.00	-8551.20	-237.06	54.80	11.92	42.53	6.90
5	<u>RPYSRQ</u>	-8988.90	-8573.70	-348.91	66.25	10.69	76.54	6.45
6	YSYPQR	-8875.00	-8539.50	-261.53	74.04	11.51	50.08	6.91
7	QYRPSQ	-8867.40	-8582.20	-275.69	9.49	12.03	28.29	7.37
8	RYSRQP	-9024.00	-8560.00	-390.84	73.14	12.78	69.72	7.99
9	SSSSSS	-8693.40	-8545.60	-94.01	53.82	12.31	35.95	6.93
10	PSPRYQ	-8828.70	-8552.10	-208.06	68.51	12.30	57.21	7.13
11	SQQQQQ	-9027.80	-8574.00	-400.51	53.31	12.98	63.83	8.77
12	SYYYYY	-8630.90	-8543.60	-51.28	36.02	11.00	16.22	7.39
13	YPQRSY	-8870.70	-8578.60	-206.29	85.89	12.80	101.02	7.39
14	SPPPPP	-8614.50	-8544.80	-22.05	47.64	13.87	29.00	10.13
15	QPSQYR	-8871.10	-8561.50	-257.30	52.22	10.90	50.32	6.98
16	RQPYSR	-8855.70	-8506.60	-257.30	91.84	11.51	34.99	7.36
17	SRRRR	-9277.70	-8541.60	-660.55	75.61	12.72	53.73	7.55
18	PQSPRY	-8856.40	-8588.30	-257.30	10.77	10.66	35.66	6.95
19	RRQPYS	-8993.10	-8545.70	-354.47	92.93	10.55	75.15	6.58
20	YRSYPQ	-8868.30	-8508.80	-245.50	114.03	12.58	59.34	7.84
21	PYQSPR	-8841.90	-8539.40	-230.11	72.34	12.83	48.34	8.39
22	QQYRPS	-8899.30	-8558.50	-289.96	50.86	13.65	45.91	7.40
23	PRYQSP	-8838.60	-8568.00	-245.22	25.40	12.28	29.98	8.17
24	RSRQPY	-8968.30	-8552.80	-369.04	46.53	11.72	35.87	7.03
25	QSQYRP	-8888.80	-8528.70	-309.15	50.97	10.54	16.22	6.56
среднее	1	1	1	1	60.37		47.42	
медиана					54.80		48.34	

Сравнительный анализ возможности точечных замен в структуре гексамера

Согласно результатам (табл. 3), полученным путём сравнения величин энергии связывания лиганда, содержащих структуры лигандов с точечными заменами, в комплексе $(-\Delta E)$, в первой позиции гексамера предпочтительными являются аминокислотные остатки R, Y или P. При вычислении $-\Delta \overline{E}$ мутантных структур по первому положению гексамера преимущество имеет структура, несущая точечную замену остатка S на R или Y, в то время, как структуры, несущие в первом положении остатки P или Q имеют величины энергии связывания, сравнимые или хуже, чем у контрольной структуры. По второму положению первичной структуры гексамера,

ДАНИЛКОВИЧ и др.

наибольшие величины $-\Delta E$ связаны с остатками R и P (табл. 3), в то время как вычисление $-\Delta \overline{E}$ указывает только на остаток P в качестве вероятного мутатора (табл. 4). Проверка данного предположения с использованием двух способов вычисления энергии связывании лиганда ($-\Delta E$ и $-\Delta \overline{E}$) в составе соответствующих комплексов, не подтвердила выводы по 1 и 2 позициям гексамера, сделанные в результате анализа таблицы 3 и таблицы 4, хотя подстановка в первую позицию, например, остатка Y, который, согласно таблице 4, также обеспечивает более высокую величину энергии связывания лиганда, по сравнению с остатком S, действительно увеличивает энергию связывания мутированного лиганда в комплексе до значений $-\Delta E = 72.79$ (ккал/моль) и $-\Delta \overline{E} = 78.14$ (ккал/моль). Возможно, обнаруженный феномен отражает ту особенность применения метода Тагучи, которая подразумевает одновременный анализ совокупности всех рассматриваемых факторов, перечисленных в матрице Тагучи.

Дизайн прототипов лиганда с использованием метода Тагучи

Обработка данных, представленных в таблице 2, по методу Тагучи предполагает вычисление средней величины значений факторов по каждому типу аминокислотного остатка для сравнения предпочтительности размещения того или иного аминокислотного остатка в определённом положении первичной структуры гексамера. В качестве критерия сравнения свойств факторов, перечисленных в ортогональной матрице L25, использовалась наименышая разница величин свободной энергий комплекса и свободных компонентов (табл. 3) либо разница величин свободной энергии комплекса и средней энергии рецептора, и энергии свободного лиганда (табл. 4).

Тип остатка	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4	Фактор 5	Фактор 6
R	74.14	74.81	58.07	70.80	51.68	73.21
Q	45.92	48.57	71.09	46.45	73.44	62.32
Р	55.53	70.53	65.77	46.97	66.28	46.65
Y	72.97	49.16	50.51	78.70	57.16	49.05
S	53.28	58.77	60.80	58.91	53.29	70.61

Таблица 3. Вычисленные средние значения энергии связывания $-\Delta E$ гексамеров, содержащих анализируемые аминокислотные остатки в позициях, соответствующих номерам факторов

Следует заметить, что два способа вычисления величины энергии связывания лиганда дают сходные результаты для всех положений в первичной структуре гексамера, кроме позиции 2, для которой в случае аминокислотного остатка R энергия связывания $-\Delta E = 74.81$ (ккал/моль) оказалась больше, чем $-\Delta E = 70.53$ (ккал/моль) для P в этом положении. В то же время, энергия связывания $-\Delta \overline{E} = 47.30$ (ккал/моль) в случае R меньше, чем $-\Delta \overline{E} = 63.86$ (ккал/моль) для P (см. табл. 4).

В каждой колонке данных, представленных в таблицах 3 и 4, были выбраны максимальные значения энергии связывания для соответствующих факторов, на основании которых предложены последовательности двух прототипов лиганда, которые приведены в таблице 5. Значения энергий связывания сконструированных прототипов лигандов оказались в обоих случаях больше контрольных величин исходного лиганда. Таким образом, с помощью использованного подхода были предложены новые пептиды, имеющие потенциал большей аффинности к рецептору, которая коррелирует с

большей энергией связывания в сравнении с нативной структурой лиганда.

Таблица 4.	Вычисленные	средние	значения	энергии	связывания	$-\Delta E$	гексамеров,
содержащих	анализируемые	е аминок	ислотные	остатки	в позициях,	COOTE	ветствующих
номерам фак	торов						

Тип остатка	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4	Фактор 5	Фактор 6
R	58.45	47.30	45.83	65.52	44.93	47.49
Q	31.80	45.85	60.91	44.51	52.86	57.04
Р	46.72	63.86	36.40	43.64	43.69	38.76
Y	60.37	41.02	43.75	37.83	49.55	41.41
S	39.74	39.06	50.20	45.59	46.05	52.39

Таблица	5. Сравнение	величин	энергии	связывания	прототипов	и исходного	лиганда	В
составе сл	южного компл	іекса.						

Критерий выбора остатков для структуры прототипа	Сконструированный прототип	−∆Е ккал/моль	$-\Delta \overline{E}$ ккал/моль	
$-\Delta E$	RRQYQR	65.24	_	
$-\Delta \overline{E}$	YPQRQQ	_	71.24	
Исходный лиганд	SQYRPS	24.31	53.81	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование ортогональной матрицы для формирования списка потенциальных прототипов лиганда позволило найти структур структуры пептидов, характеризующиеся более высокой энергией связывания, отражающей большую аффинность к рецептору, чем соответствующая величина исходного природного лиганда. Были определены структуры двух прототипов пептидного лиганда YPQRQQ и RRQYQR, которые выведены по результатам анализа термодинамических характеристик структур, полученных с использованием ортогональной матрицы L25 по методу Тагучи. Оба прототипа характеризуются более высокой энергией связывания, чем исходная структура. Энергия связывания новых структур больше не только энергии связывания исходного пептида, но и среднего и медианного значений энергий связывания для всего набора пептидов ортогональной матрицы L25.

Примененный подход использования ортогональной матрицы для оптимизации структуры пептидов открывает возможности для создания новых лигандов пептидной природы, обладающих большей аффинностью к рецептору.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки Российской Федерации, Соглашение №14.607.21.0133 (RFMEFI60715X0133).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Taguchi G. System of experimental design: engineering methods to optimize quality and minimize costs. V. 1. Kraus International Publications, 1987.
- Данилкович А.В., Туробов В.И., Соболев Е.В., Удовиченко И.П. Математическая биология и биоинформатика. 2016. Т. 11. № 2. С. 385–393. doi: <u>10.17537/2016.11.385</u>

- 3. Abbasian M.A., Moallem M., Fahimi B. Double stator switched reluctance machines (DSSRM): fundamentals and magnetic force analysis. *IEEE Trans. on Energy Con.* 2010. V. 25. P. 589–597.
- Cobb B.D., Clarkson J.M. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Res.* 1994. V. 22. P. 3801–3805.
- 5. Burch G.J., Ferguson C.H., Cartwright G., Kwong F.Y. Application of Taguchi experimental design to the optimisation of a baculovirus expression system. *Biochem. Soc. Trans.* 1995. V. 23. P. 107S.
- 6. Jeney C., Dobay O., Lengyel A., Adam E., Nasz I. Taguchi optimisation of ELISA procedures. *J. Immunol. Methods*. 1999. V. 223. P. 137–146.
- Martenson R.E. Myelin basic protein speciation. In: *Experimental Allergic Encephalomyelitis. A Useful Model for Multiple Sclerosis: Progress in Clinical and Biological Research.* V. 146. Eds. E.C. Alvord Jr., M.W. Kies, A.J. Suckling. New York: Alan R. Liss, Inc, 1983.
- Case D.A., Cheatham T.E.III., Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K.M., Onufriev A., Simmerling C., Wang B., Woods R.J. The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry*. 2005. V. 26. P. 1668–1688.
- 9. Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997. V. 18. P. 2714–2723.
- 10. Tsui V., Case D.A. Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. *Biopolymers (Nucl. Acid. Sci.)*. 2001. V. 56. P. 275–291.
- Onufriev A., Bashford D., Case D.A. Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized Born model. *Proteins*. 2004. V. 55. P. 383–394.
- Van Gunsteren W.F., Billeter S.R., Eising A.A., Hünenberger P.H., Krüger P., Mark A.E., Scott W.R.P., Tironi I.G. *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*. Switzerland, Zürich: Vdf Hochschulverlag AG and der ETH Zürich, 1996. 1042 p.
- Case D.A., Betz R.M., Cerutti D.S., Cheatham III T.E., Darden T.A., Duke R.E., Giese T.J., Gohlke H., Goetz A.W., Homeyer N., Izadi S., Janowski P., Kaus J., Kovalenko A., Lee T.S., LeGrand S., Li P., Lin C., Luchko T., Luo R., Madej B., Mermelstein D., Merz K.M., Monard G., Nguyen H., Nguyen H.T., Omelyan I., Onufriev A., Roe D.R., Roitberg A., Sagui C., Simmerling C.L., Botello-Smith W.M., Swails J., Walker R.C., Wang J., Wolf R.M., Wu X., Xiao L., Kollman P.A. *AMBER 2016*. San Francisco: University of California, 2016.
- 14. Case D.A., Cheatham T.E.III., Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K.M., Onufriev A., Simmerling C., Wang B., Woods R.J. The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry*. 2005. V. 26. P. 1668–1688.
- Duan Y., Wu C., Chowdhury S., Lee M., Xiong G., Zhang W., Yang R., Cieplak P., Luo R., Lee T., Caldwell J., Wang J., Kollman P. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *Journal of Computational Chemistry*. 2003. V. 24. P. 1999–2012.
- Danilkovich A.V., Sobolev E.V., Tikhonov D.A., Udovichenko I.P., Lipkin V.M. Distinctive H–(RLDL)₄–OH Peptide Complexes Potentiate Nanostructure Self-Assembling in Water. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2012. V. 443. P. 96–99.
- 17. Still W.C., Tempczyk A., Hawley R.C., Hendrickson T. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *Journal of the American Chemical Society*. 1990. V. 112. P. 6127–6129.

Рукопись поступила в редакцию 20.11.2017. Дата опубликования 01.12.2017.