



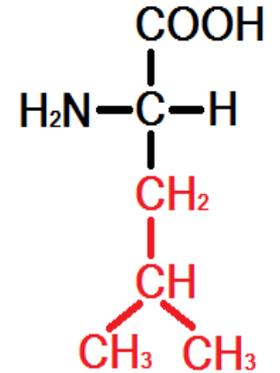
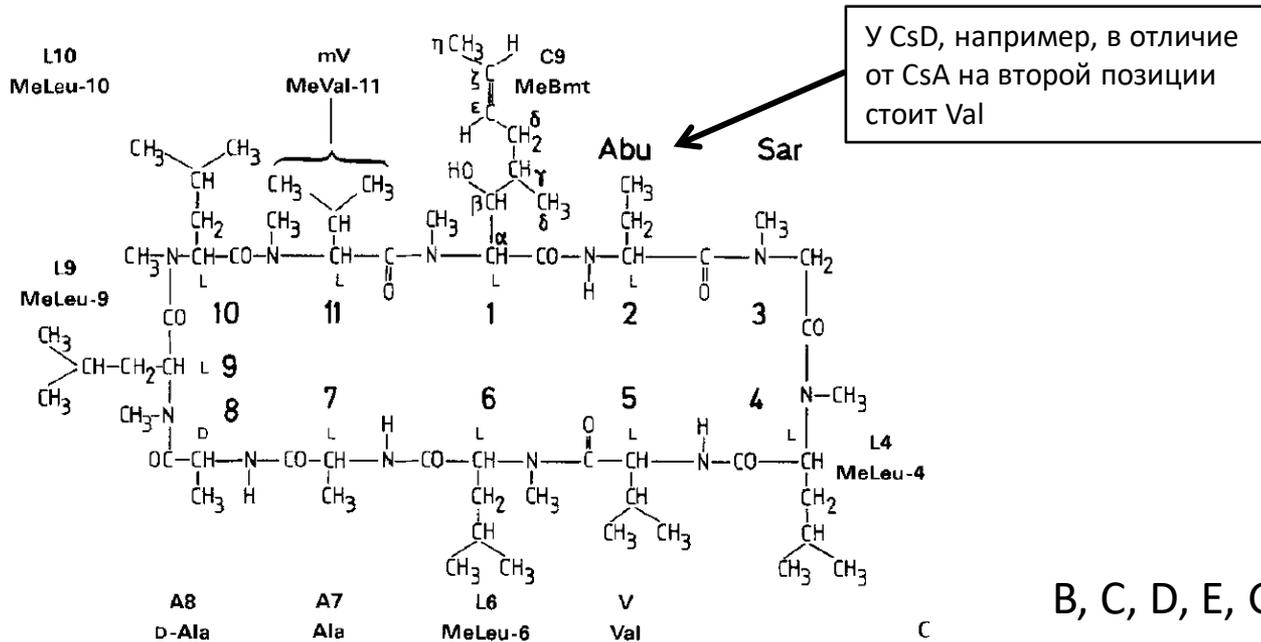
**Изучение пространственной структуры и внутримолекулярной подвижности некоторых циклоспоринов в растворах и в комплексе с мицеллами додецилфосфохолина методами ЯМР спектроскопии и молекулярной динамики**



Кобчикова Полина (ОИЯИ, ЛНФ, научный сотрудник – постдок)

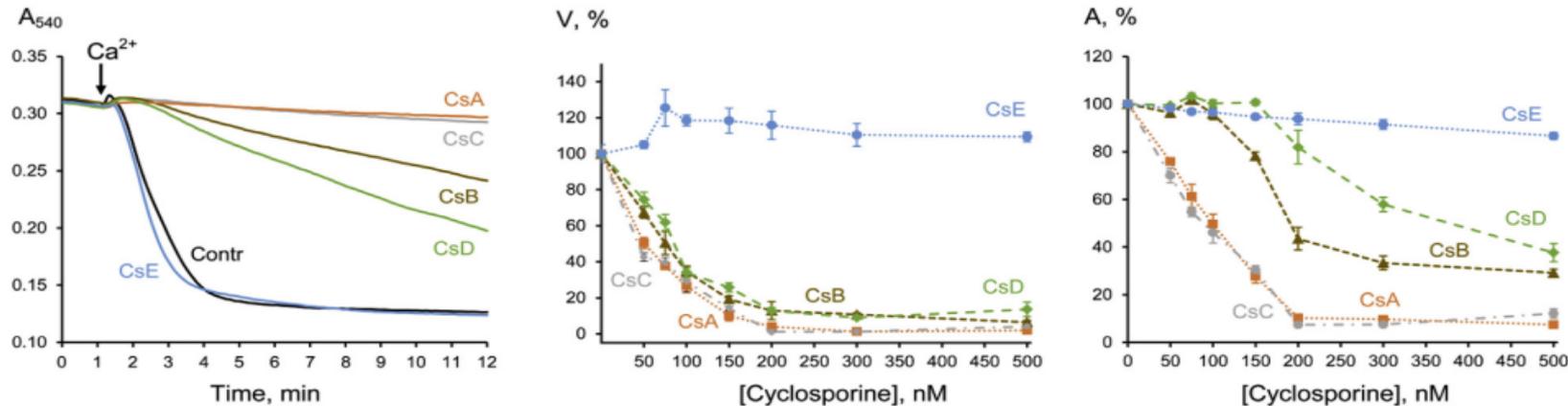
# Циклоспорины

Циклоспорины – семейство замкнутых в кольцо пептидов, состоящих из 11 аминокислот; продуцируются почвенными грибами вида *Tolypocladium inflatum*. Самый известный из них, циклоспорин А (CsA) – широко используется в медицине, так как обладает иммуносупрессивными свойствами.



Номенклатура.  
Химическая структура  
аминокислоты лейцин  
(Leu)

## Активность в митохондриальных мембранах

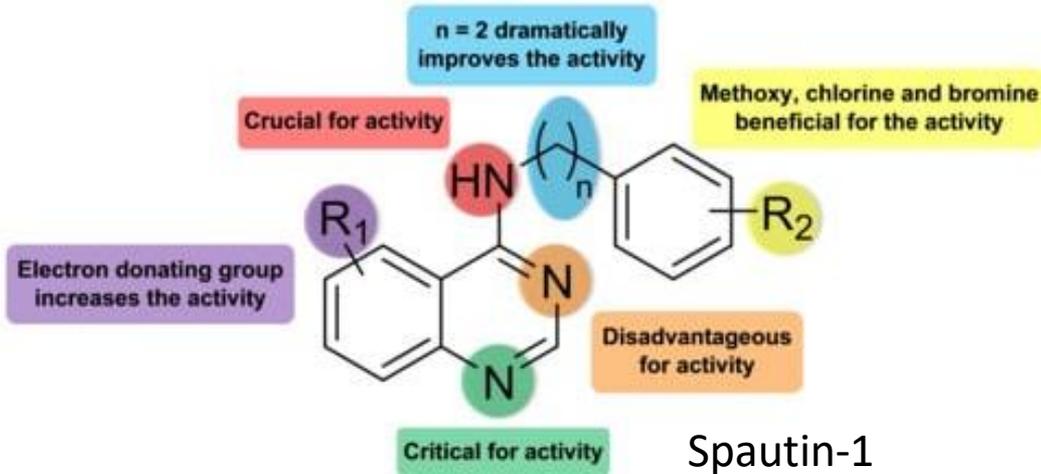


Влияние циклоспоринов на открытие пор MPT в митохондриях печени крысы. (а) Набухание митохондрий (0,5 мг/мл) в отсутствие и в присутствии 300 мМ циклоспоринов (А-Е) индуцировали добавлением 50 мМ Ca<sup>2+</sup>. Контрольный участок был получен без циклоспоринов. (б) – Зависимость относительной скорости Ca<sup>2+</sup>-зависимого набухания митохондрий печени крысы от концентрации циклоспоринов. (в) Зависимость относительной амплитуды Ca<sup>2+</sup>-зависимого набухания митохондрий печени крысы от концентрации циклоспоринов. Значение 100% соответствует отсутствию пептида.

Результаты этого исследования согласуются с представлением о корреляции между гибкостью пептидной цепи и ее биодоступностью.

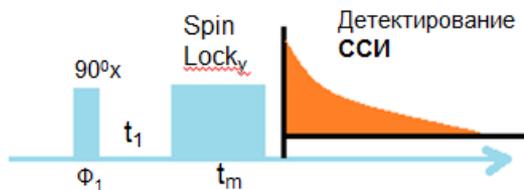
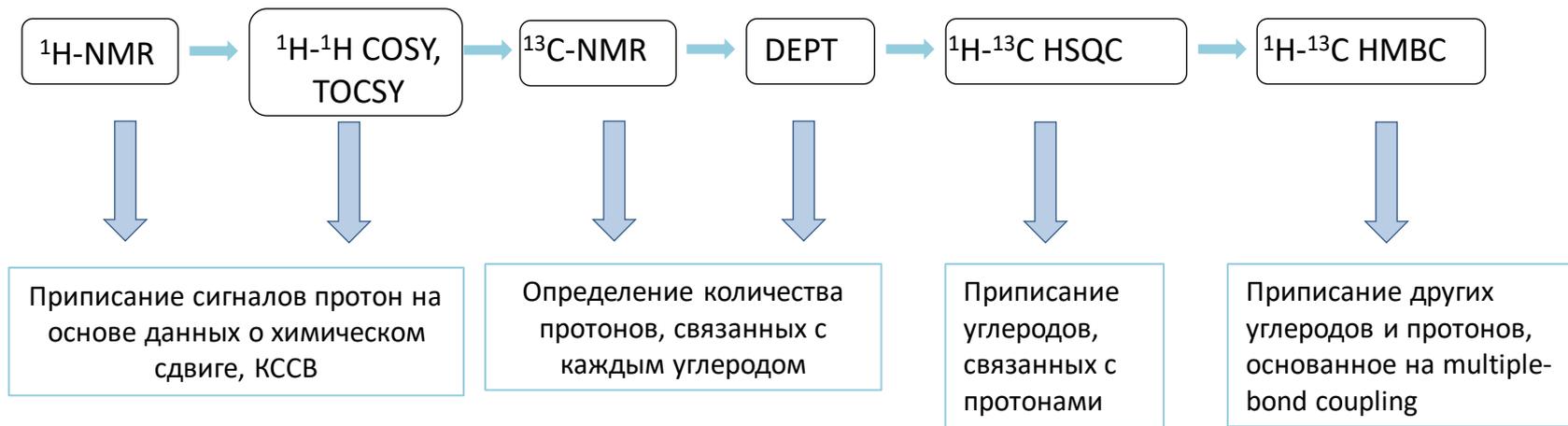
## Structure–activity relationship (SAR)

## Conformation–activity relationship



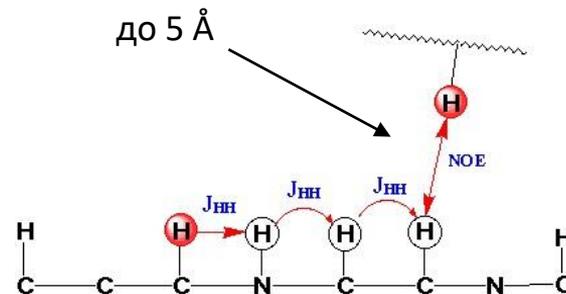
Каждая функциональная группа обладает электронным эффектом, эффектом растворимости и стерическим эффектом.

## Метод исследования: ЯМР-спектроскопия высокого разрешения

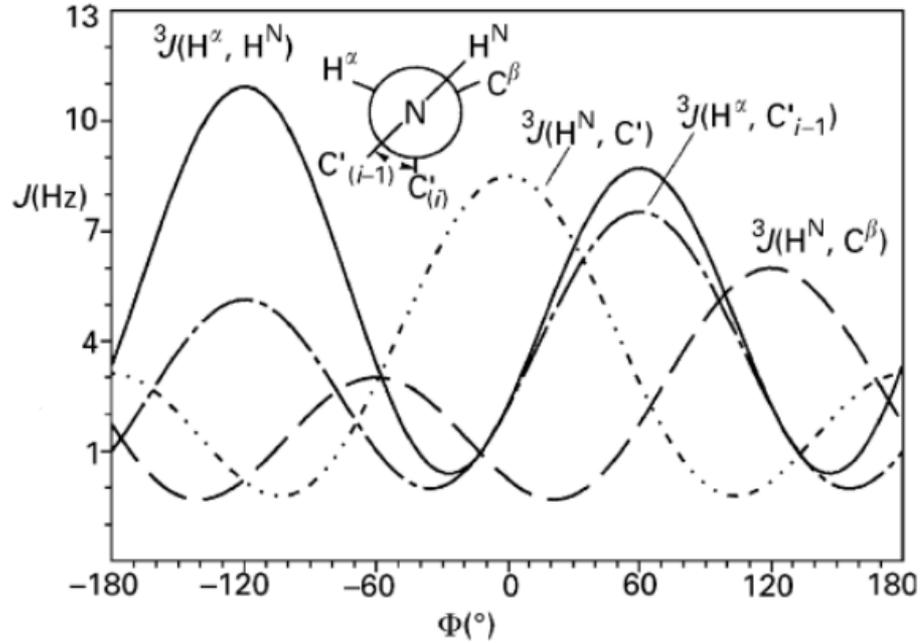


Импульсная последовательность 2D-NOESY

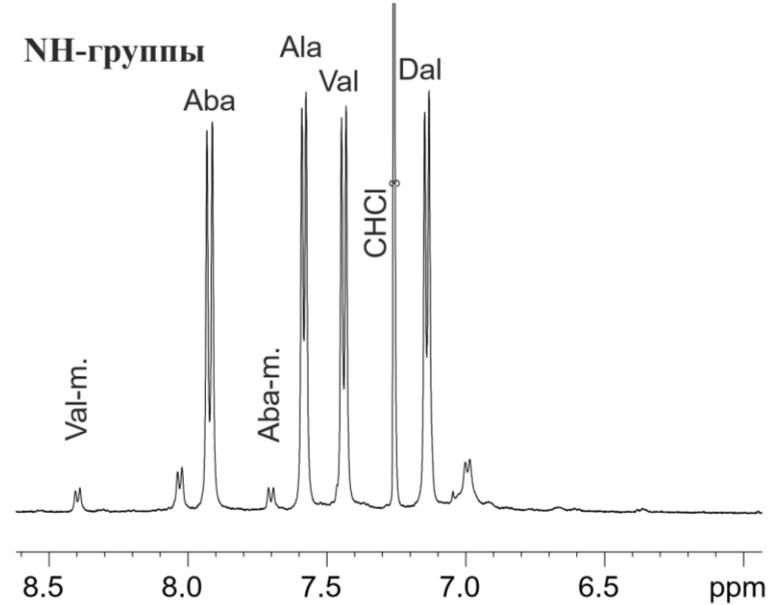
Эффект NOE (ЯЭО).  
2D-NOESY & ROESY



## Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ)



$${}^3J = 6.51\cos^2(\phi \pm 60^\circ) - 1.76\cos(\phi \pm 60^\circ) + 1.6$$



ЯМР-спектр CsA в  $\text{CDCl}_3$  при 36°C (500 МГц)

# Метод исследования: моделирование молекулярной динамики

Симуляции основаны на законе

Ньютона:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \mathbf{F}_i$$

**GROMACS**

*fast, flexible & free*



**Траектория моделирования**

Позиция всех N атомов молекулы в каждый момент времени



**«доступная» информация**

- углы
- расстояния



**обработка**

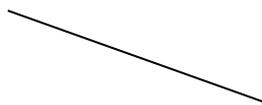
- Инструменты Gromacs
- инструменты Python (пакеты MD Analysis, scikit-learn)



**таблицы**



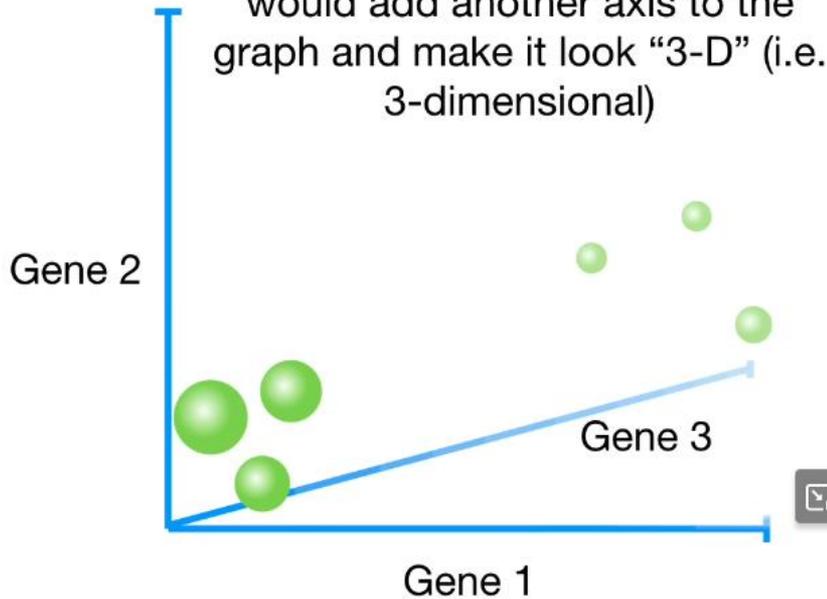
**графики**



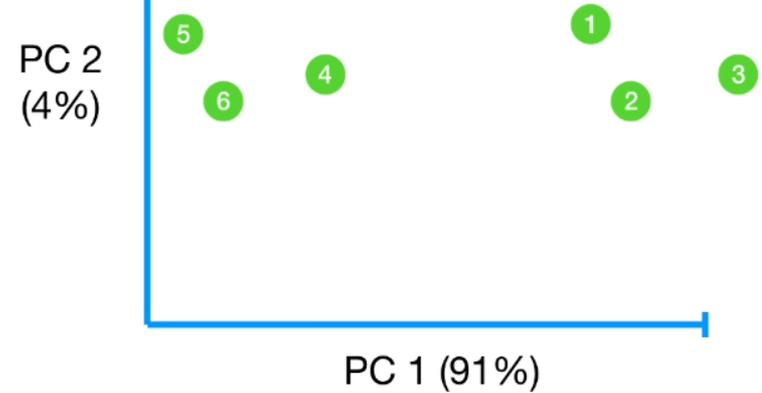
$$(\bar{\mathbf{r}}_1(t), \dots, \bar{\mathbf{r}}_N(t))$$

## PCA

If we measured 3 genes, we would add another axis to the graph and make it look “3-D” (i.e. 3-dimensional)



So we're going to talk about how PCA can take 4 or more gene measurements (and thus, 4 or more dimensions of data), and make a 2-D PCA plot...



# DPCA

Общее движение vs внутреннее (эффекты трансляции и вращения)  
Учитываются граничные условия (+180° и -180°)

$$q_{2n-1} = \cos \varphi_n$$

$$q_{2n} = \sin \varphi_n$$

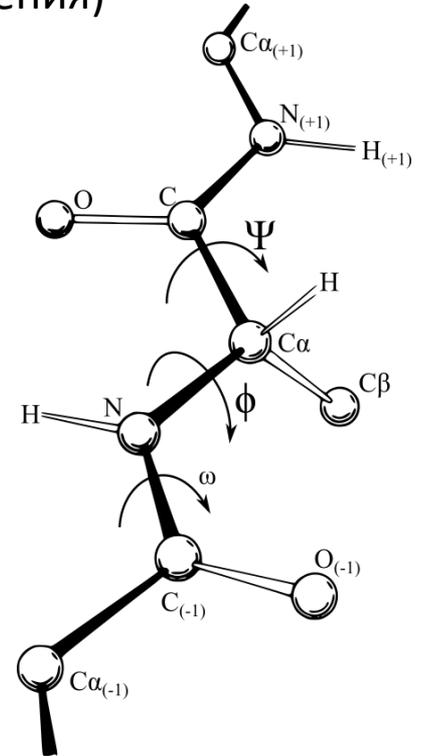
$$\begin{aligned} \text{tg} \langle \varphi_n \rangle &= \frac{\langle y \rangle}{\langle x \rangle} \\ &= \frac{\langle \sin \varphi_n \rangle}{\langle \cos \varphi_n \rangle} \end{aligned}$$

Нет цис-транс переходов



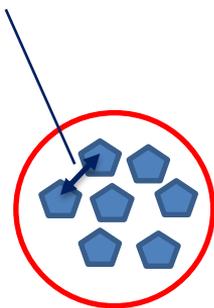
33 → 22

$$z_n = e^{i\varphi_n}$$

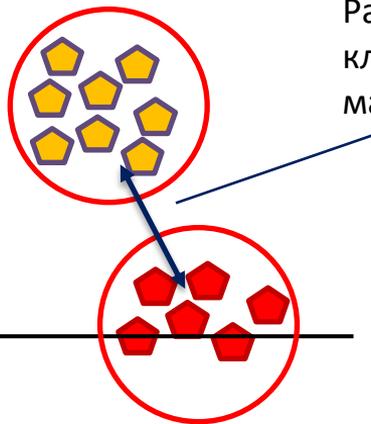


# Кластеризация траекторий двугранных углов, полученных из моделирования молекулярной динамики

Внутрикластерное расстояние минимизировано



Расстояние между кластерами максимизировано

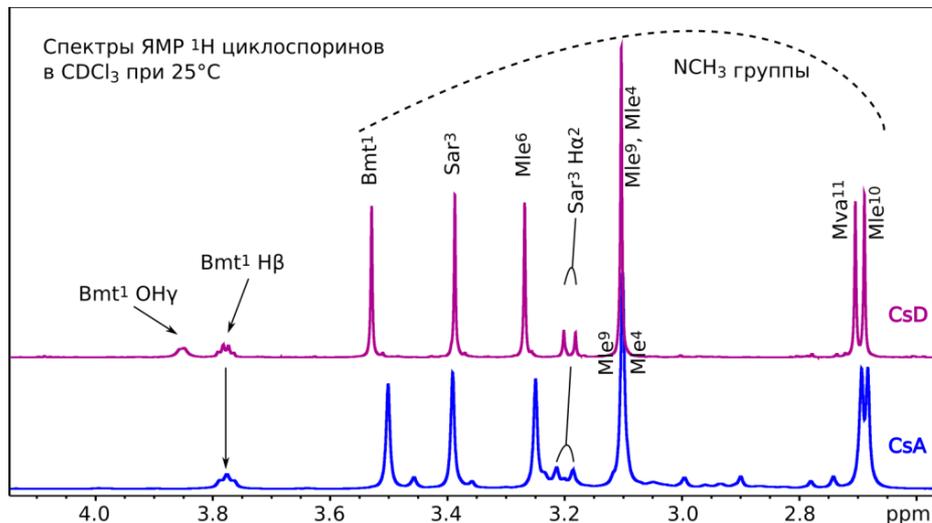


## К-средние

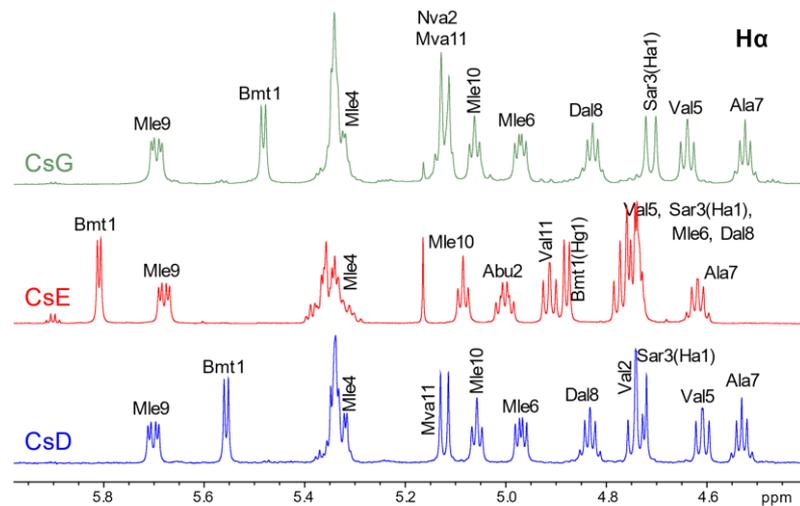
Поиск групп объектов, в которых объекты в группе будут похожи (или связаны) друг на друга и отличаться (не связаны) от объектов в других группах.

- Нужно заранее знать число кластеров  $k$
- Алгоритм очень чувствителен к выбору начальных центров кластеров

# Исследование циклоспоринов в $CDCl_3$



Часть ЯМР спектров циклоспоринов CsA (500 МГц) и CsD (700 МГц) в  $CDCl_3$ , показывающая сигналы N-метильных групп и некоторые сигналы треолина (Bmt) и саркозина (Sar)



Спектры 1D-ЯМР CsG, CsE и CsD в  $CDCl_3$  (25°C, 700 МГц). Гидроксильный протон Bmt1(H $\gamma$ 1) появляется в спектрах некоторых циклоспоринов при разных химических сдвигах

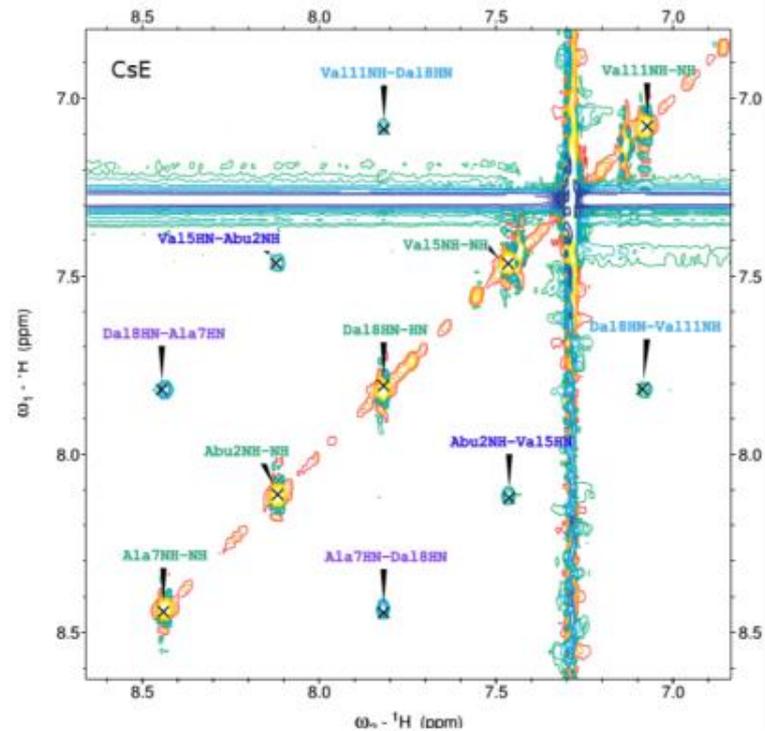
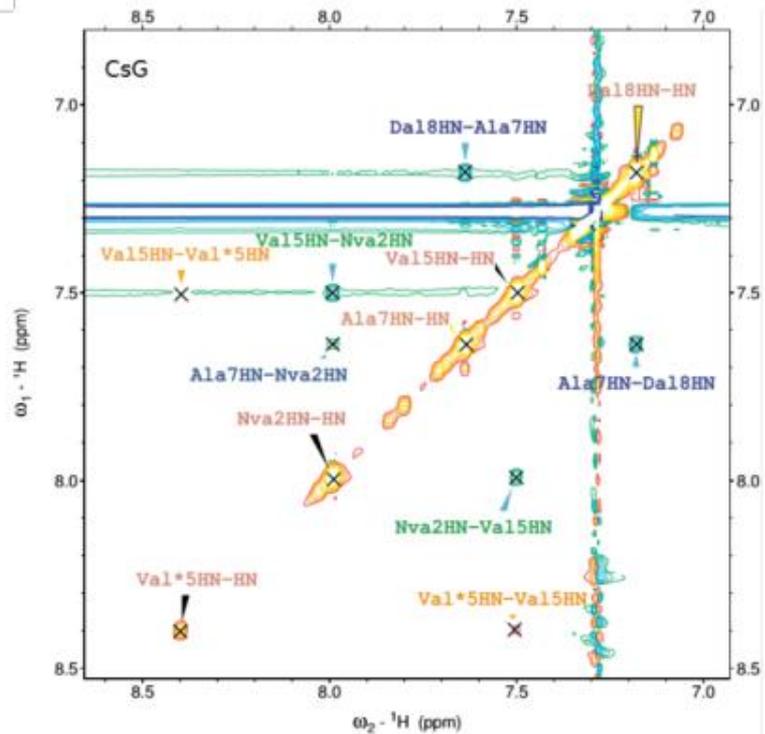
## KCCB ( $^3J_{HN-H\alpha}$ ) циклоспоринов

	CsA	CsB	CsC	CsD	CsE	CsG	CsH	CsL
Bmt1	-	-	-	-	-	-	-	7.5
Xxx2	8.00	9.6	9.6	9.9	9.8	9.74	5.8	9.9, 10.0
Val5	7.5	9.1	8.9	8.1	8.4	8.32	7.2	8.6, 8.7
Ala7	7.2	7.4	7.0	7.5	9.1	7.44	5.2	7.3, 6.9
Dal8	7.5	7.8	7.2	8.0	6.2	7.88	8.1	8.4, -
Val11	-	-	-	-	9.7	-	-	-

отвечает другому двугранному углу  $\psi$

Положение сигналов в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  четырех пептидов (B, C, D, E) и CsA в  $\text{CDCl}_3$  оказалось сходным

res	CsB			CsC		
	C $\alpha$	H $\alpha$	C'	C $\alpha$	H $\alpha$	C'
1	58.81	5.434	<b>169.78</b>	59.14	5.326	170.78
2	<b>42.82</b>	5.247	173.95	<b>51.36</b>	4.935	<b>173.49</b>
3	50.32	4.721, 3.201	171.12	<b>50.01</b>	4.736, 3.214	<b>170.66</b>
4	55.52	5.333	169.99	<b>55.33</b>	5.334	<b>169.85</b>
5	55.32	4.684	<b>173.62</b>	<b>54.75</b>	4.78	<b>173.23</b>
6	55.43	4.981	171.60	<b>54.89</b>	5.053	<b>171.31</b>
7	48.72	4.518	171.17	48.82	4.442	171.28
8	45.18	4.821	173.45	45.13	4.825	173.58
9	48.32	5.691	170.35	48.22	5.685	170.67
10	57.60	5.079	170.15	57.50	5.102	170.29
11	57.96	5.135	173.37	58.11	5.155	173.90
res	CsD			CsE		
	C $\alpha$	H $\alpha$	C'	C $\alpha$	H $\alpha$	C'
1	59.00	5.555	170.72	58.93	5.834	170.82
2	<b>53.97</b>	4.748	173.90	49.24	<b>5.027</b>	<b>174.43</b>
3	50.52	4.722, 3.183	171.20	50.53	4.783 3.223	171.68
4	55.57	5.322	170.02	55.66	5.370	<b>169.88</b>
5	55.63	4.614	173.81	55.44	4.798	173.74
6	55.34	4.972	171.53	<b>57.06</b>	4.770	<b>171.31</b>
7	48.58	4.532	<b>171.05</b>	48.80	4.644	171.39
8	45.12	4.835	<b>173.39</b>	<b>46.89</b>	4.769	<b>174.40</b>
9	48.25	5.698	170.31	<b>49.40</b>	5.710	169.89
10	57.64	5.060	170.08	57.77	5.109	168.49
11	57.86	5.121	173.65	<b>52.48</b>	4.937	173.40

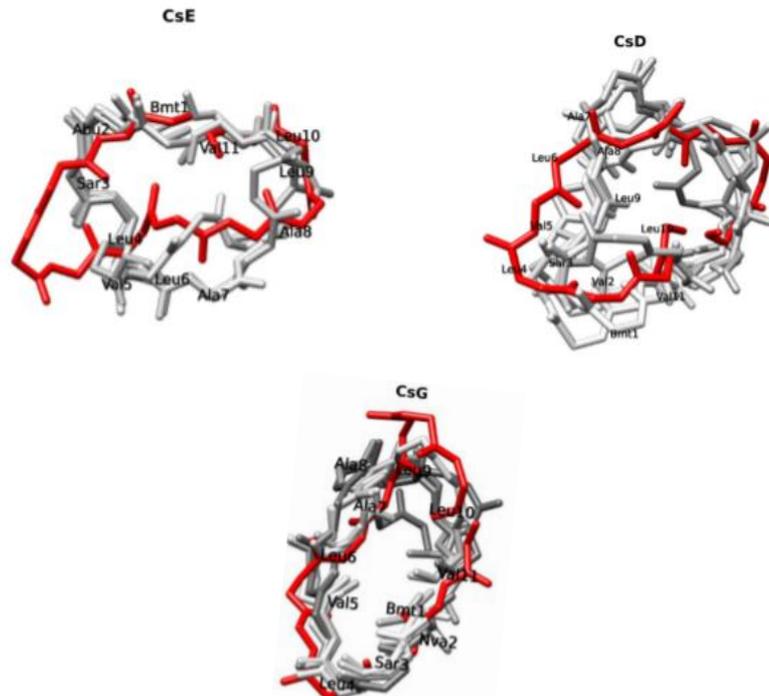


Низкопольная область 2D ROESY спектров CsG и CsE (25°C, 700 МГц, время смешивания 350 мс). Val\*5 на левой панели принадлежит минорному конформеру, соответствующий обменный кросс-пик положительный.

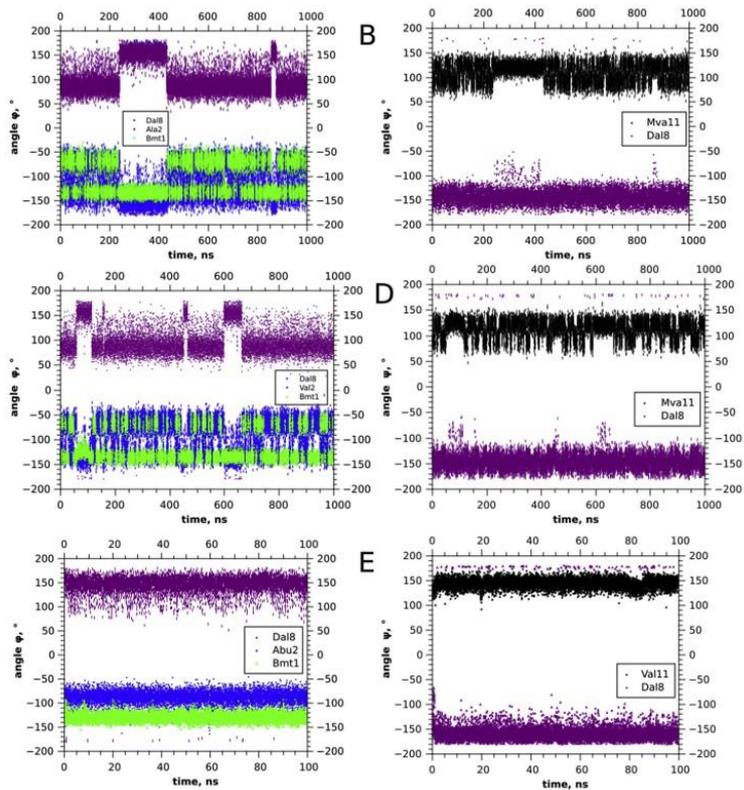
Межпротонные расстояния между парами атомов, встречающихся в разных вариантах циклоспоринов наиболее часто

CsE	r, Å	CsG	r, Å	CsD	r, Å
Bmt1Ha-Abu2NH	2.27	Bmt1Ha-Nva2HN	2.15	Bmt1Ha-Val2HN	2.18
Bmt1Hb-Abu2NH	2.64	Bmt1Hb-Nva2HN	2.70	Bmt1Hb-Val2HN	2.53
Sar3Ha1-Mle4H	2.42	Sar3Ha1-Mle4H	2.33	Sar3Ha2-Mle4NCH3	2.76
<b>Bmt1Hd2-Mle6Ha</b>	2.12	<b>Bmt1Hd2-Mle6Ha</b>	2.65	<b>Bmt1Hd2-Mle6Ha</b>	2.73
<b>Abu2NH-Val5NH</b>	2.74	<b>Nva2HN-Val5HN</b>	2.66	<b>Val2NH-Val5NH</b>	3.87
Mle6Ha-Ala7NH	1.83	Mle6Ha-Ala7HN	2.08	Mle6Ha-Ala7HN	2.26
<b>Mle6Hg-Dal8NH</b>	3.43	<b>Mle6Hg-Dal8HN</b>	2.70	<b>Mle6Hg-Dal8HN</b>	2.81
Ala7NH-Dal8NH	2.57	Ala7HN-Dal8HN	2.71	Ala7NH-Dal8NH	2.78
Mle9Ha-Mle10Ha	1.84	Mle9Ha-Mle10Ha	1.91	Mle9Ha-Mle10Ha	1.98
Val5Hb-Mle6H	3.22	Val5Hb-Mle6H	3.17		
<b>Bmt1Ha-Ala7NH</b>	2.52	<b>Bmt1Ha-Ala7HN</b>	2.68		
Mle4Ha-Val5NH	2.78	Mle4Ha-Val5HN	2.79		
Mle4H-Val5NH	3.28	Mle4H-Val5HN	3.06		
Abu2Ha-Sar3H	2.61	Nva2Ha-Sar3H	2.58		
		Val5Ha-Mle6H	2.34	Val5Ha-Mle6H	2.5
		Dal8Ha-Mle9H	2.70	Dal8Ha-Mle9H	2.58
		Ala7Ha-Dal8HN	2.58	Ala7Ha-Dal8HN	2.71
		<b>Bmt1Hd2-Mle4Ha</b>	3.02	<b>Bmt1Hd2-Mle4Ha</b>	2.76

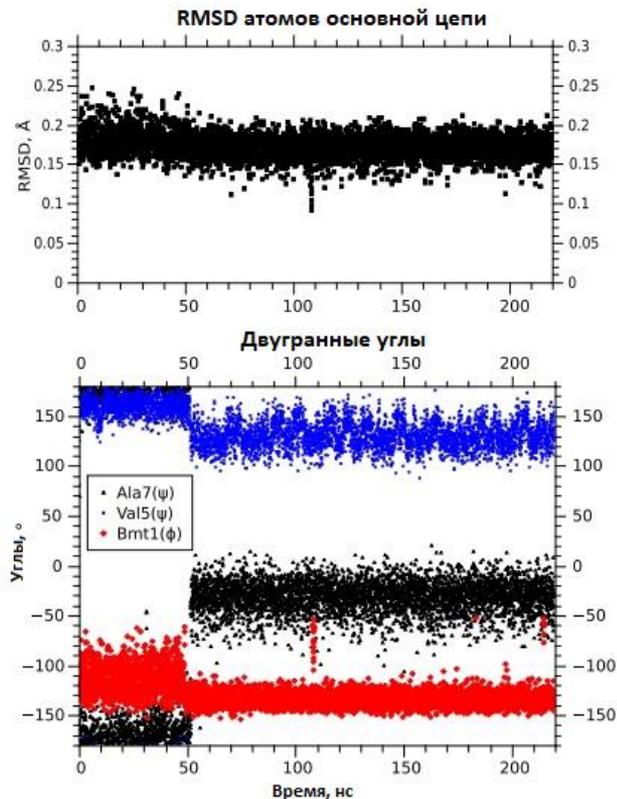
Расстояния оценивались по интенсивности кросс-пиков, принимая за эталон расстояние в метиленовой группе в саркозиновом остатке (1.7-1.8 Å)



Структуры циклоспоринов. Выбранные модели, полученные XPLOR-NIH, показаны серым цветом; от GROMACS, в красном цвете. Изображения были подготовлены в UCSF Chimera.

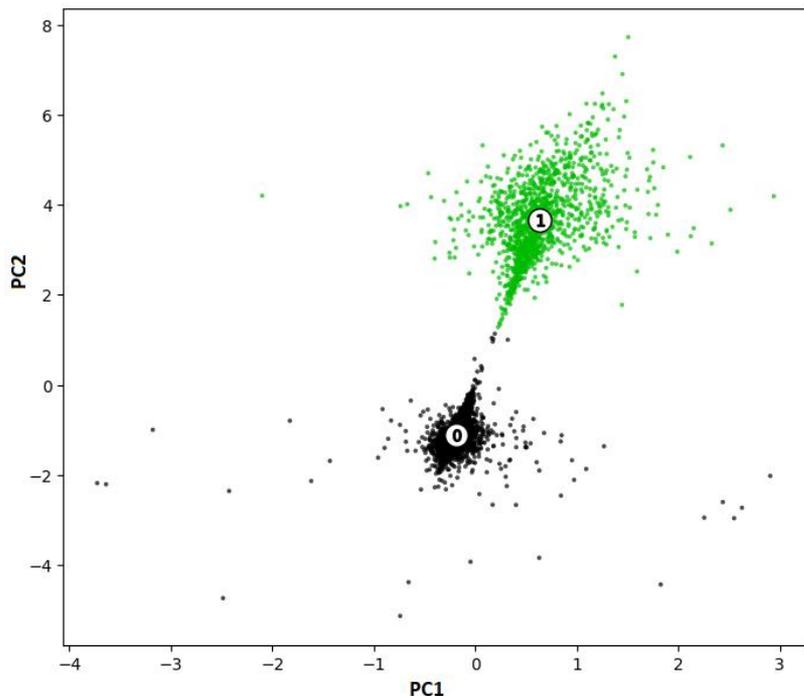


Эволюция некоторых двугранных углов основной цепи (сверху вниз: CsB, CsD, CsE). Данные получены из моделирования молекулярной динамики в хлороформе,  $T = 298\text{K}$ .



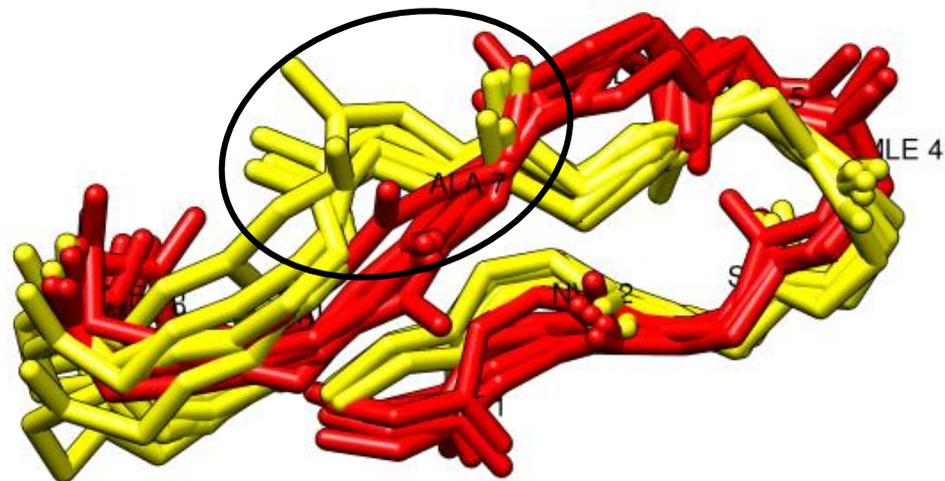
Временные зависимости СКО основной цепи и некоторых двугранных углов в первые 220 нс МД для CsG в  $\text{CHCl}_3$  при 298 K. Различимы два режима эволюции. Через 50а нс молекула принимает стабильную конформацию, аналогичную той, что наблюдалась для CsE.

## Кластеризация траекторий двугранных углов CsG



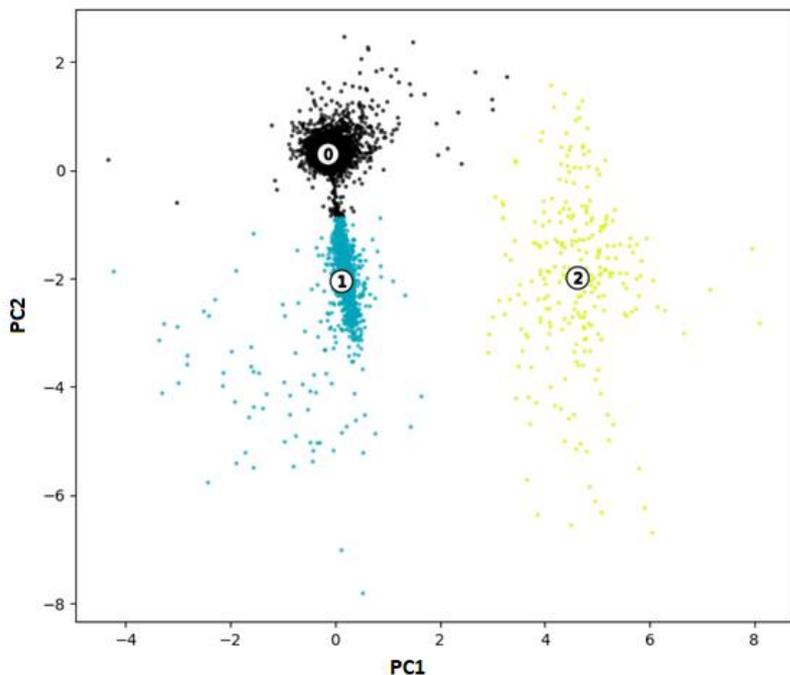
Кластеризация **CsG**. Результат снижения размерности, видно два кластера. Две первые компоненты PCA объясняют 53,8% дисперсии системы. Большая часть информации содержится именно в первой компоненте (53%). Двугранные углы  $\psi_7$  и  $\phi_8$  дают наибольший вклад в первую компоненту.

Область 7-8  
аминокислоты



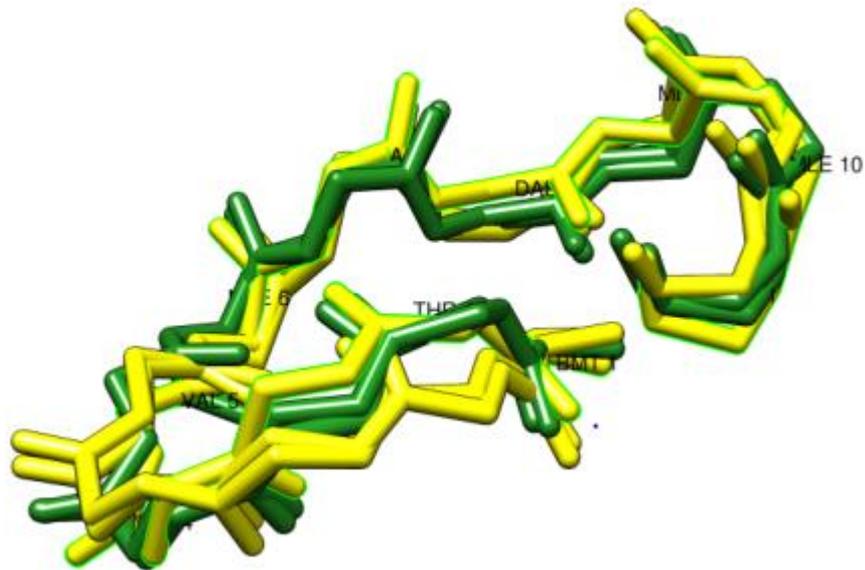
Красные структуры - нулевой кластер (76%), желтые структуры - первый кластер (24%). Область 6-8 аминокислот показывает наибольшую расхожимость, что согласуется с выводами, полученными с помощью PCA

0ой кластер - 86%, 1ый - 10%, 2ой - 2%



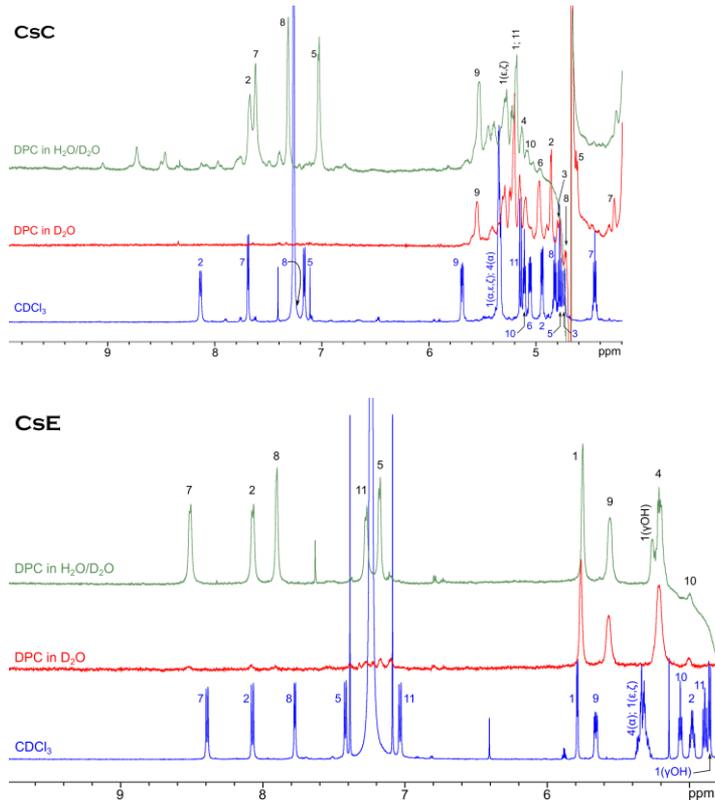
Кластеризация CsC в хлороформе по траектории двугранных углов, полученных в результате МД симуляции

Наибольший вклад в первую компоненту давали углы  $\phi 1$  и  $\psi 1$ . Во вторую компоненту наибольший вклад давали углы  $\phi 6$  и  $\psi 6$ .

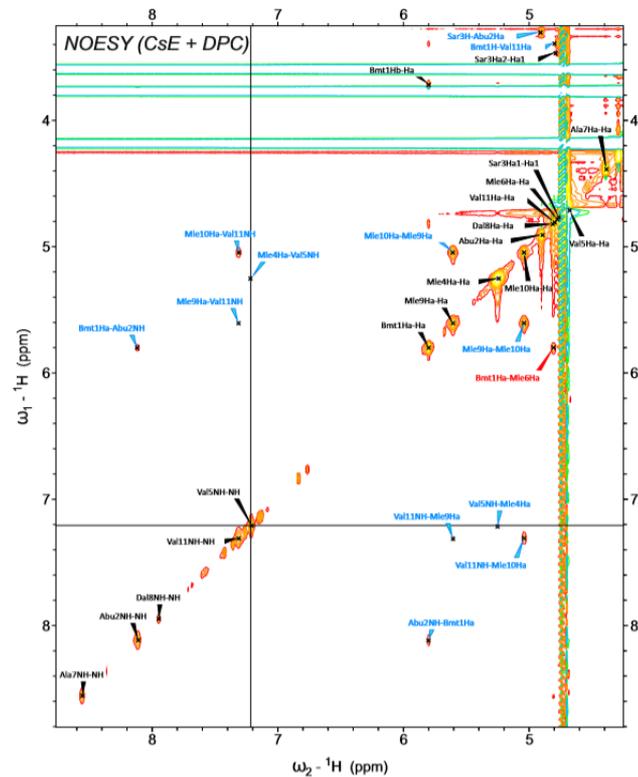


CsC в CDCl<sub>3</sub>. Зеленые структуры - нулевой кластер (86%), желтые структуры - первый кластер (10%). Область 1-2 аминокислот показывает наибольшую расхожимость

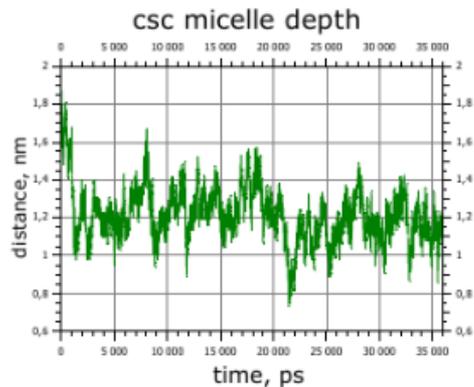
# Исследование циклоспоринов в комплексе с мицеллами додецилфосфохолина (ДФХ)



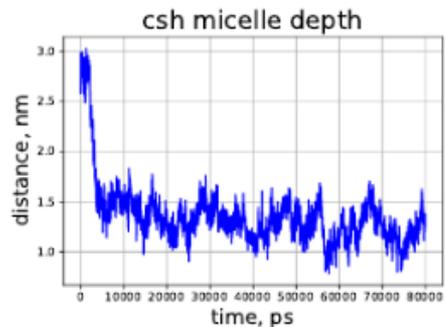
Спектры ЯМР <sup>1</sup>H CsC (сверху) и CsE (снизу) в хлороформе в сравнении со спектрами в мицеллярном растворе.



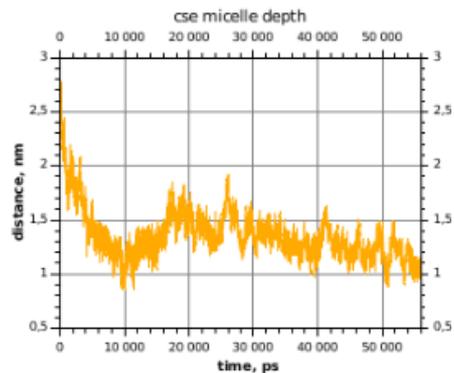
ЯМР-спектр NOESY CsE, T = 293 K, область NH и Ha сигналов



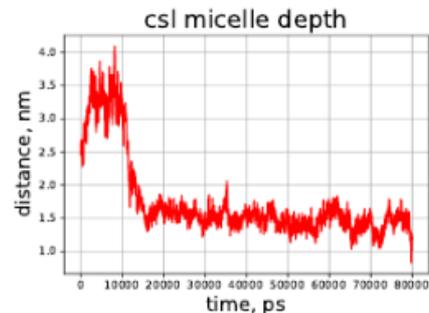
a



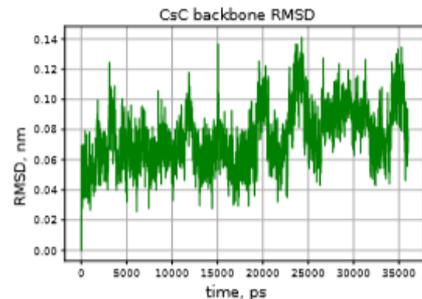
c



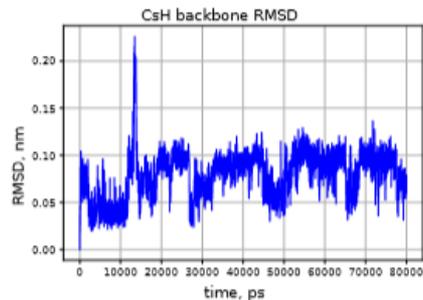
b



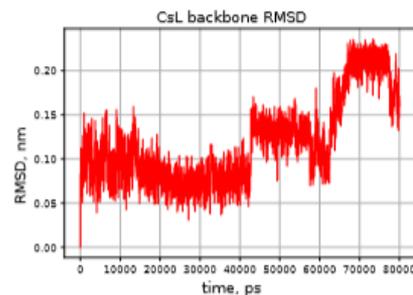
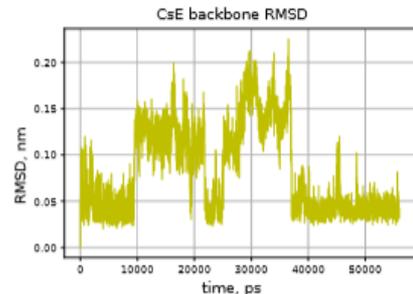
d



a

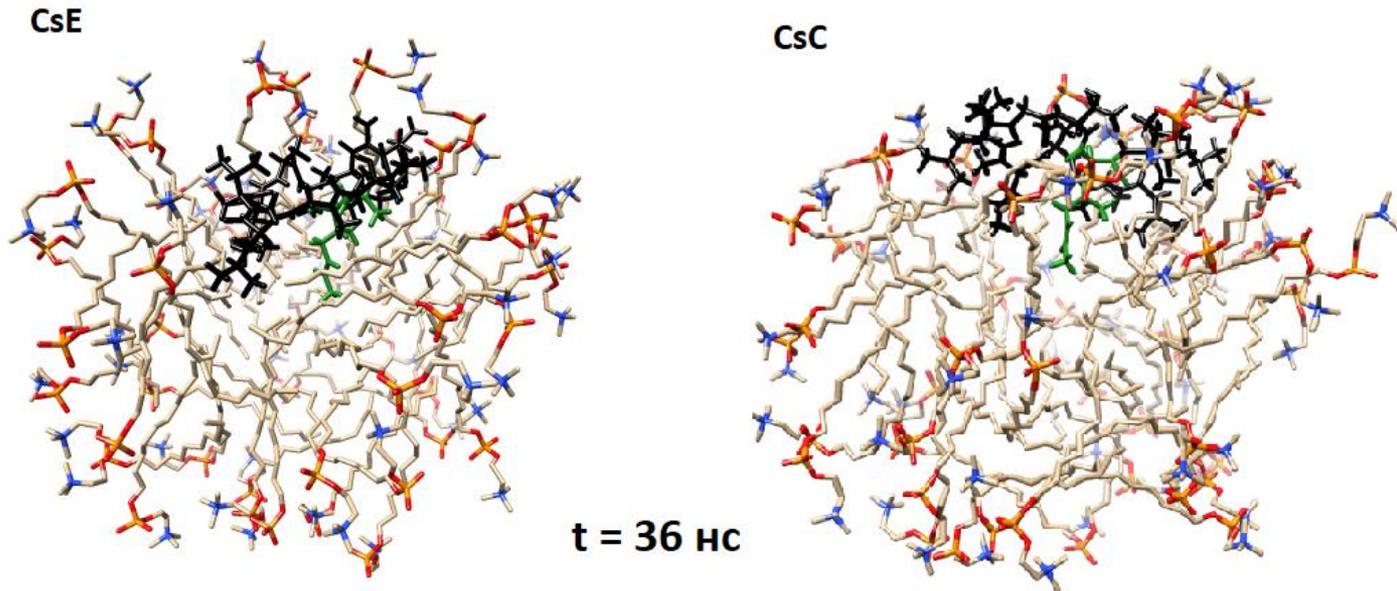
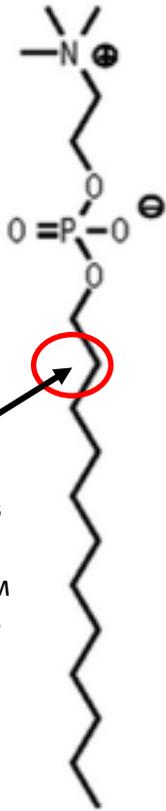


b

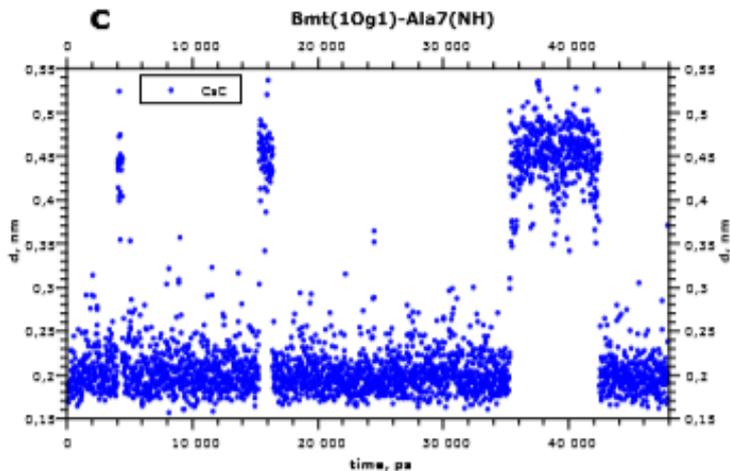
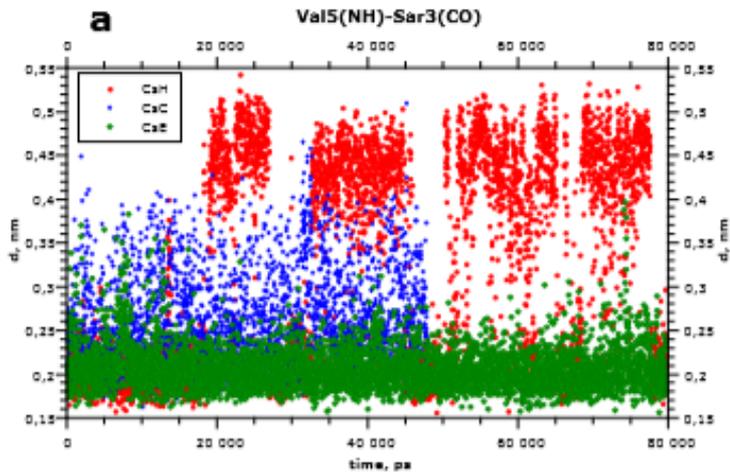


Графики расстояний между центром геометрии пептида и центром мицеллы. Циклоспорины С, Е, Н, L.

RMSD положений атомов относительно первой структуры. Циклоспорины С, Е, Н, L.

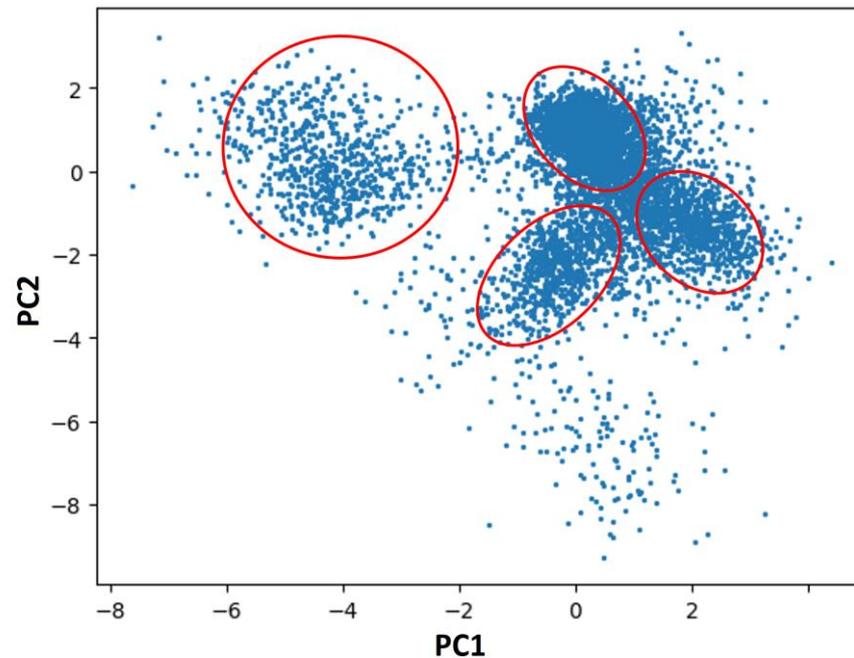
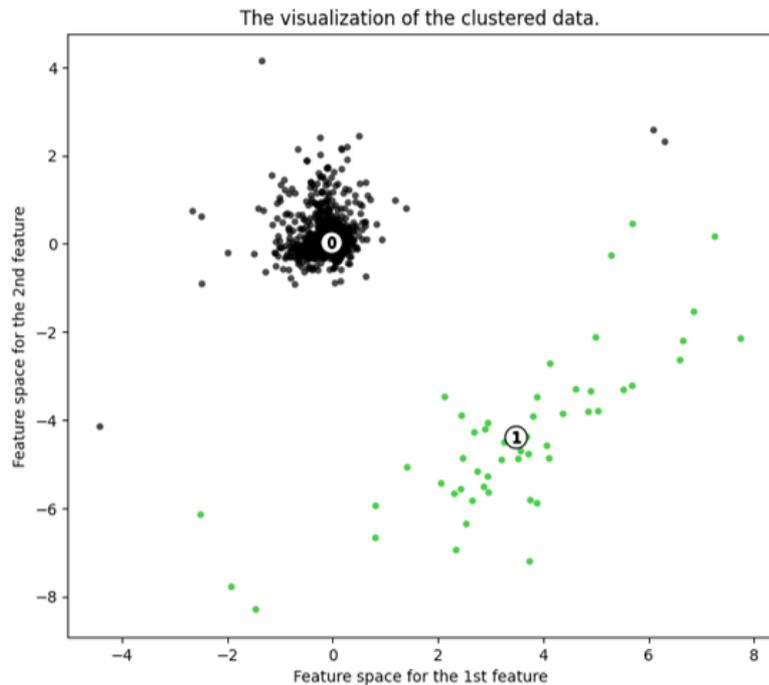


Структуры CsE, CsC (черный цвет). Можно видеть, что цепь остатка Vmt (зеленого цвета) ориентирована в центр.



Появление водородных связей во время моделирования. В левой колонке указаны взаимодействующие атомы (O — карбоксильный кислород, H — амидный протон,  $N\gamma$  и  $O\gamma$  — атомы в  $\gamma$ -позициях). В таблице показано, какие H-связи являются стабильными: относительная продолжительность их существования (%) во время моделирования и продолжительность самого длительного обнаруженного периода существования (нс, в скобках).

	CsC	CsL	CsH	CsE
Bmt1(H)-Mle10(O)	–	100%	–	–
Bmt1(Og1)-Ala7(H)	81% (14.2)			
Bmt1(Hg1)-Bmt1(O)	97% (18.7)	91% (38)	44% (12.5)	19% (19.9)
Val5(H)-Sar3(O)	96% (21.4)		47% (13.4)	100%
Bmt1(Hg1)-Val5(O)	13% (1.2)	43% (8)		
Thr2(Hg1)-Thr2(O)	58% (2.4)	–	–	–
Thr2(H)-Mle6(O)				88.8% (19)
Ala7(H)-Bmt1(Og1)		50% (18)		
Dal8(O)-Val11(H)				51% (5.8)
Dal8(H)-Val11(O)		76%		58% (9.6)

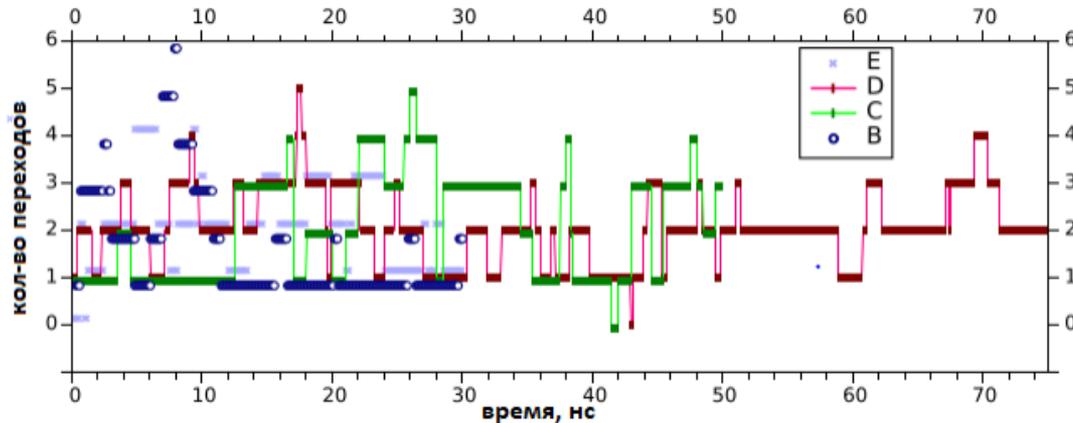


Кластеризация CsE в результате МД симуляции в двух разных средах. Слева - CsE в растворе хлороформа (два конформера, но нулевой кластер содержит в себе 90% всех структур). Справа - CsE в комплексе с мицеллами.

## Высокотемпературная молекулярная динамика

Стимулируются переходы через высокоэнергетические барьеры за счет установления высокой температуры в системе.

600K → 700K → 800K



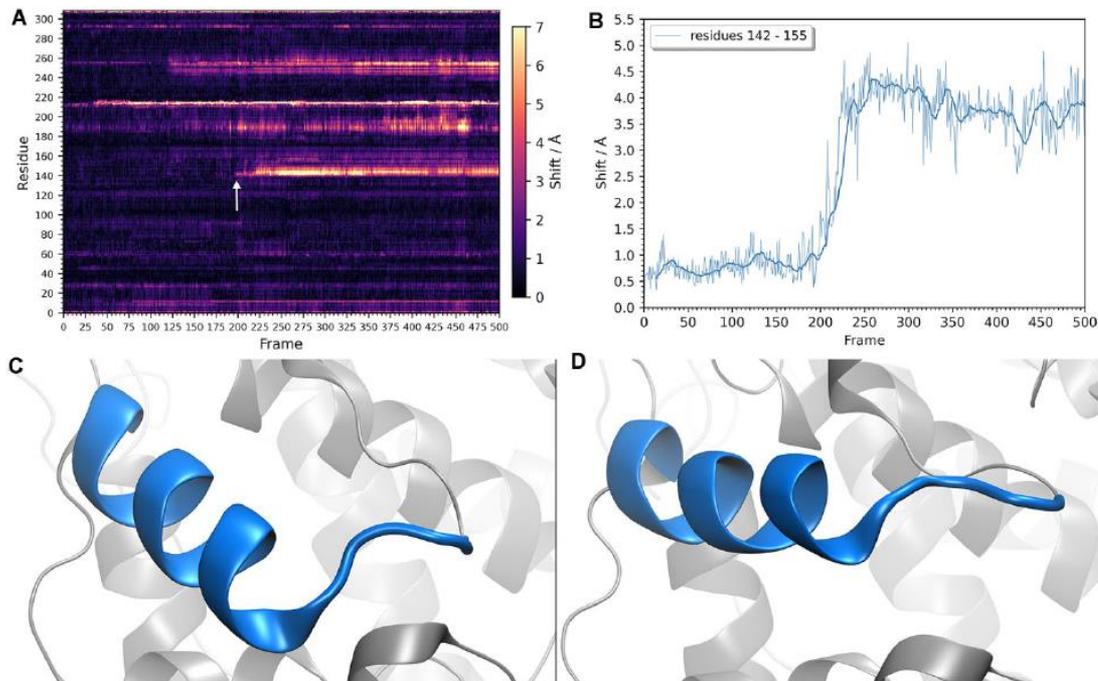
Динамика количества **цис-транс-переходов** в пептидных связях циклоспоринов B-E по сравнению с основным состоянием (в кристаллических и неполярных растворителях), возникающих при высокотемпературном МД-моделировании при 800 К в воде. Различные треки немного сдвинуты по вертикали для наглядности

Три пептидные связи остаются в транс-конформации во всех четырех пептидах на всей моделируемой траектории; это  $\omega_1$  (Bmt1–Xxx2),  $\omega_4$  (Mle4–Val5) и  $\omega_6$  (Mle6–Ala7).

Пептидная связь Mle9–Mle10 имеет цис-конформацию при комнатной температуре; однако в смоделированных высокотемпературных системах это первый угол, который меняется на 180°.

- **Пространственные структуры** циклоспоринов в комплексе с ДФХ и в растворе хлороформа **отличаются ориентацией боковых цепей**. Форма основной цепи в обеих средах одинакова: **основная цепь образует вытянутое кольцо** с остатками 2-5 и 8-11, расположенными на изгибах.
- **Жесткость основной цепи CsE** наблюдается как в растворе  $CDCl_3$ , так и в комплексе с мицеллами фосфолипидов, что **может быть одной из причин слабого по сравнению с другими циклоспоринами взаимодействия CsE с митохондриальным поровым комплексом**. Однако в системе CsE–ДФХ эта жесткость не столь абсолютна.
- **Применение алгоритмов снижения размерности пространства и кластеризации к траекториям двугранных углов** циклоспоринов позволило однозначно найти кластеры пространственных структур, значимо отличающихся друг от друга. Так, например, было выявлено, что **CsE имеет больше кластеров в комплексе с мицеллами ДФХ** в то время, как **в хлороформе наблюдается один основной кластер**. Кроме того, **подход**, используемый в работе **позволил однозначно найти участки** наибольшего расхождения между структурами в разных кластерах. Так, **для CsG было установлено, что область 7-8 аминокислот является наиболее подвижной**.

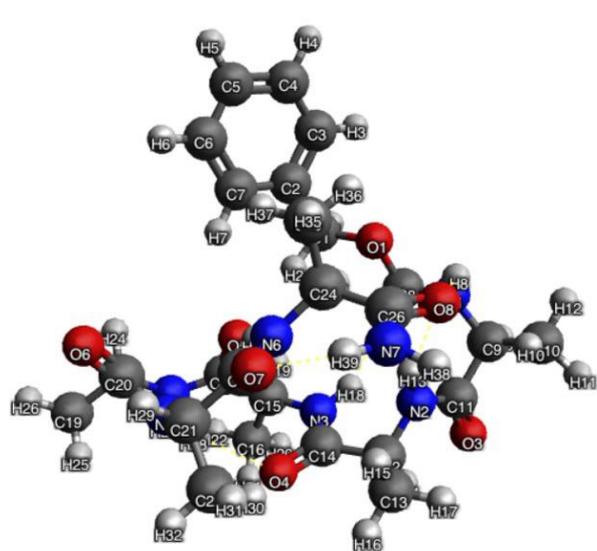




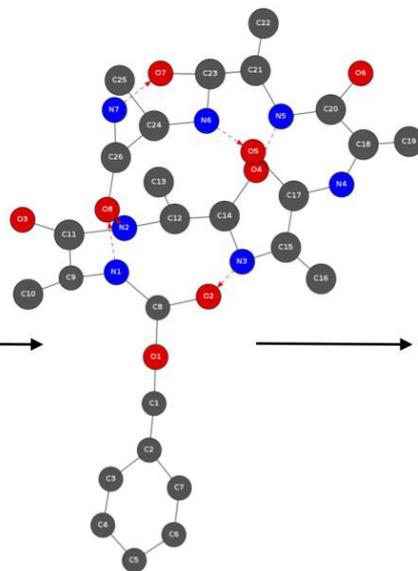
A trajectory map analysis of a recombinant type of horseradish peroxidase enzyme MD simulation. ( **A** ) A trajectory map of the simulation; the white arrow indicates the band at region 142–155 whose shifts are plotted on a shift graph on the panel **B** . Region 142–155 (shown in blue) before the conformational change, on panel **C** , and after the conformational change, on panel **D** . On the shift graph is superposed a moving average of 15 frames

# Topological 2D-MolGraphs for conformational recognition

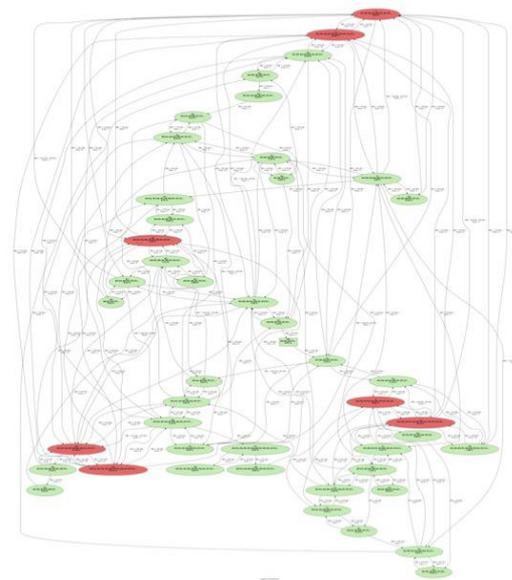
$$G = (V, E_C, A_H, E_I, E_O)$$



3D structure



2D graph of the conformation



Graph of transitions

*software GaTewAY?*

Algorithmic graph theory for post-processing molecular dynamics Trajectories, 2022

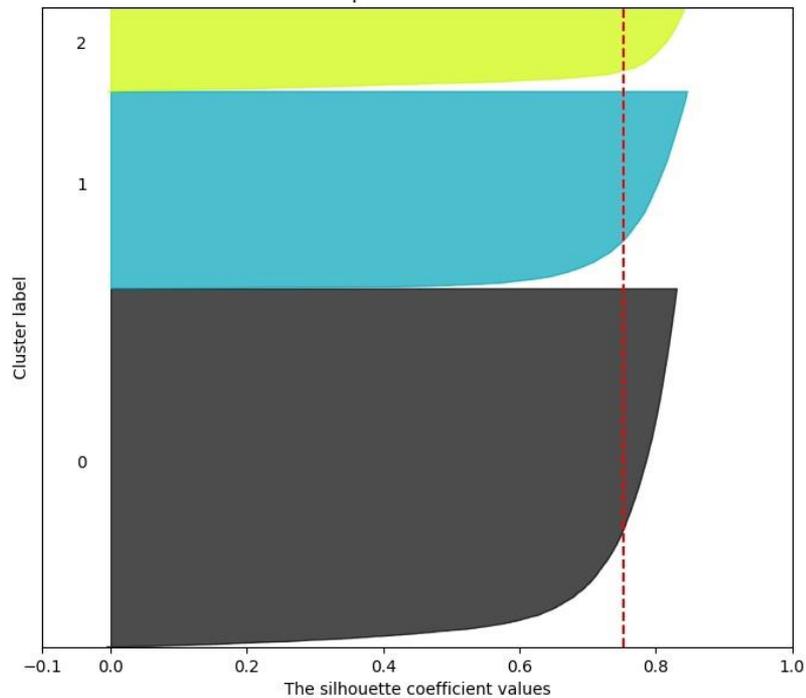
$$\frac{1}{2} \left( \frac{I_{AB}}{n_B I_{AA}} + \frac{I_{BA}}{n_A I_{BB}} \right) = \sigma(\omega, \tau C, r) \cdot \tau_{mix}$$

$$r_{ij} = r_{cal} \left( \frac{\sigma_{cal}}{\sigma_{ij}} \right)^{\frac{1}{6}}$$

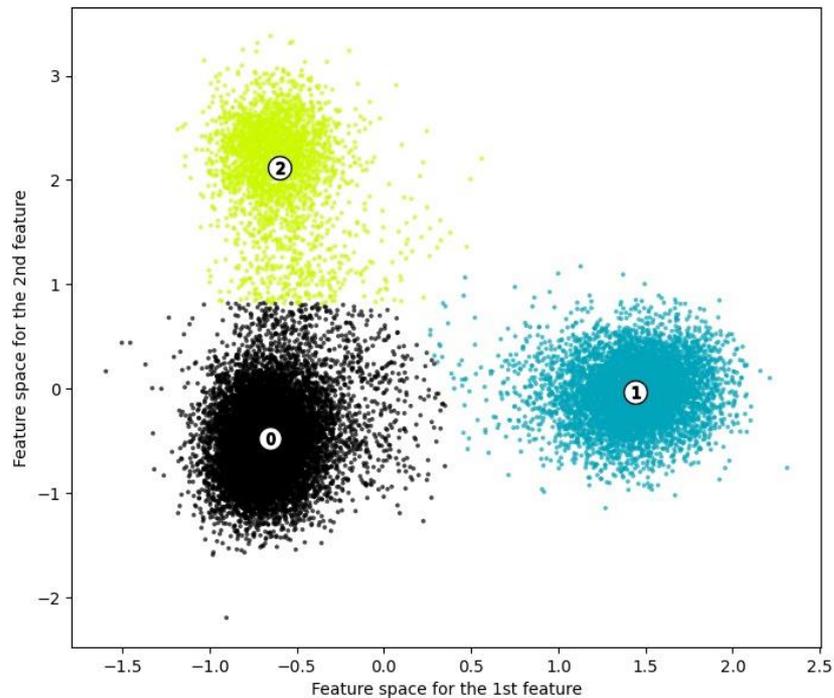


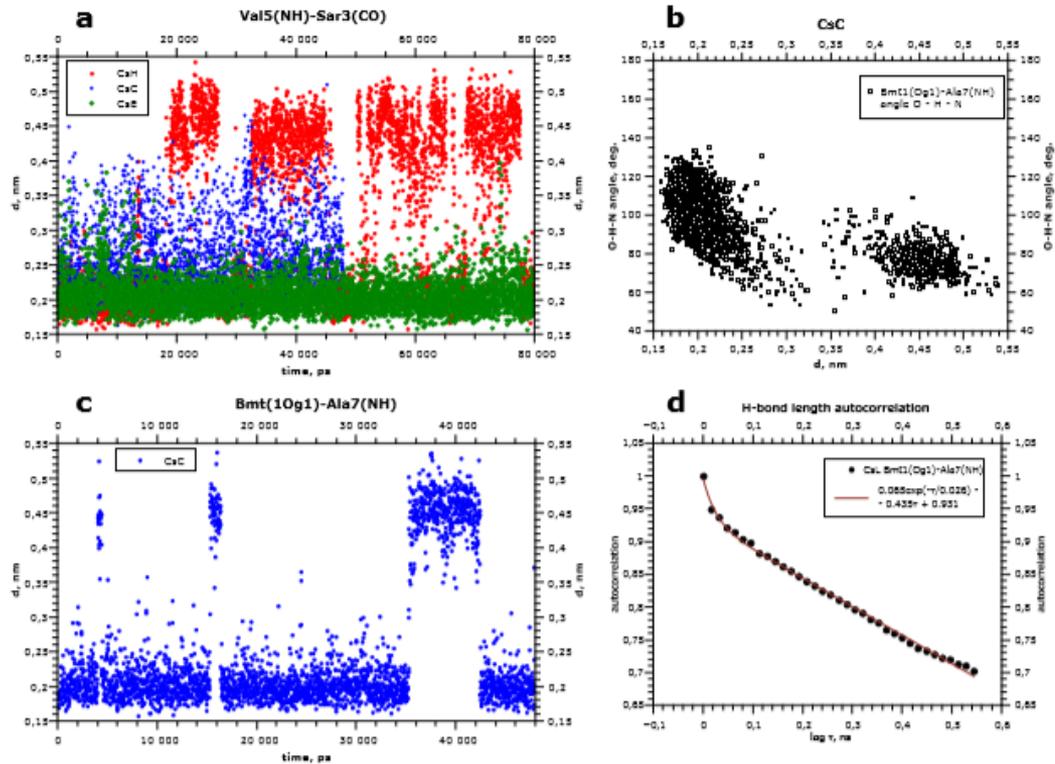
## Silhouette analysis for KMeans clustering on sample data with $n\_clusters = 3$

The silhouette plot for the various clusters.



The visualization of the clustered data.





(а,с) Эволюция некоторых водородных связей в циклоспоринах. (b) Корреляция между расстоянием О—Н и углом О—Н—N в случае бимодального поведения, когда водородная связь разрывается и появляется снова. (d) Пример автокорреляции для функции существования водородной связи