

ВИЗУАЛЬНО-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВНУТРЕННИХ ПОЛОСТЕЙ ДВУХ ХИРАЛЬНЫХ ФОРМ ДИФЕНИЛАЛАНИНОВЫХ НАНОТРУБОК

© 2020 г. С.В. Филиппов, В.С. Быстров

*Институт математических проблем биологии РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. проф. Виткевича, 1*

E-mail: fsv141@mail.ru

Поступила в редакцию 06.12.2019 г.

После доработки 16.02.2020 г.

Принята к публикации 17.02.2020 г.

Методом визуально-дифференциального анализа конформационных особенностей (био)макромолекулярных структур проведено теоретическое исследование различий в структурной организации дифенилаланиновых нанотрубок D- и L-хиральных форм. Отмечены общие черты пространственной организации внутренних поверхностей каналов нанотрубок: зеркальность расположения гидрофильных атомов и равные площади их проекций, свидетельствующие о схожем характере гидратации внутренних полостей каналов дифенилаланиновых нанотрубок D- и L-хиральностей. Выявлены различия меньшего порядка: больший размер полости канала у нанотрубок L-формы, а также большая однородность укладки дифенилаланиновых слоев у D-формы. Полученные результаты коррелируют с экспериментальными данными.

Ключевые слова: нанотрубки, дифенилаланин, Blender, ImageJ, гинсометрические проекции.

DOI: 10.31857/S0006302920030035

Самоорганизация и самосборка сложных биомолекулярных структур являются одними из важнейших биологических явлений. Пептидные нанотрубки на основе аминокислоты фенилаланина и дифенилаланина [1] – характерный пример самоорганизующихся молекулярных структур. Самосборка таких нанотрубок в водных средах происходит достаточно быстро при определенных условиях, которые влияют на скорость их роста, на форму самоорганизующихся структур (их толщину и длину) и другие физические свойства [1]. Благодаря широкому спектру свойств эти структуры являются перспективными для различных применений в нанотехнологиях, нанoeлектронике и биомедицине. Так, нанотрубки на основе дифенилаланина (ФФ-НТ) исследуются для использования их как основы систем доставки лекарств. Помимо полной биосовместимости они крайне удобны для введения в них химических и функциональных модификаторов. Например, показана их пригодность для доставки лекарств, когда моделью доставляемого лекарства послужил краситель родамин Б [2]. Если же их химически присоединить к фолиевой кисло-

те/магнитным наночастицам, ФФ-НТ становятся системами доставки противораковых и противовоспалительных препаратов [3, 4].

В то же время известно, что в зависимости от конформации и типа стереоизомера («левой» (L) или «правой» (D) хиральности) первичной структуры аминокислоты свойства любого материала, собранного на их основе, также изменяются. При этом важным моментом является тот факт, что жизнь всегда использует только один из энантиомеров. С точки зрения хиральности все макромолекулы белков и ферментов во всех живых организмах состоят в основном только из L-аминокислот. Усложнение этих макромолекул в возрастающей иерархии структур белков и ферментов приводит к закономерной смене и чередованию знака хиральности [5]. При этом биологическая активность лекарственных препаратов, имеющих также различную хиральность, может быть совершенно различной. «Правые» и «левые» лекарства, взаимодействуя с хиральными молекулами в организме, могут действовать по-разному. Поэтому возникает необходимость в чистых энантиомерах, так как часто только один из них обладает требуемым терапевтическим эффектом, тогда как второй антипод может в лучшем случае быть бесполезным, а в худшем – вызвать нежела-

Сокращение: ФФ НТ – нанотрубки на основе дифенилаланина.

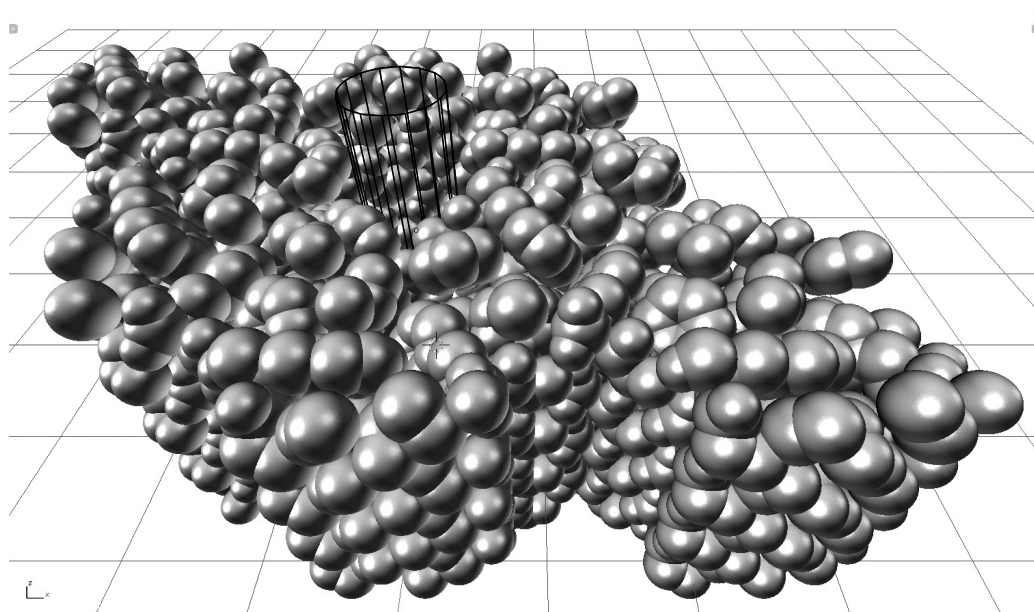


Рис. 1. Перспективное отображение 3D-модели четырех слоев D-формы ФФ-НТ в видовом окне Blender, использованной для построения цилиндрических проекций. В виде проволочного каркаса показан проекционный цилиндр, вставленный внутрь канала нанотрубки.

тельные побочные эффекты или даже быть смертельно токсичным [6].

С учетом всего вышесказанного становится ясно, что исследования конформационных особенностей ФФ-НТ крайне важны. Однако трехмерные методы анализа 3D-моделей таких наноструктур не всегда удобны и информативны. В особенности это касается разных хиральных форм ФФ-НТ, для которых, казалось бы, очевидные различия в пространственной организации двух форм крайне сложно однозначно определить, систематизировать и зафиксировать [1, 7, 8].

Одним из наиболее наглядных и информативных методов, способных выявить нюансы структурной организации разных изомерных форм одного соединения, является предлагаемый нами метод построения «гипсометрических» карт (био)макромолекул [9]. Особенно естественным выглядит применение данного метода к объектам, имеющим цилиндрическую форму (идеально «подходящую» для цилиндрического проецирования их внутренних и внешних поверхностей) — таким как ФФ-НТ.

МЕТОДЫ

В среде открытого 3D-редактора Blender v.2.79b при помощи разработанного нами программного обеспечения [9–11] были построены 3D-модели (рис. 1) L- и D-форм ФФ-НТ (на основе данных рентгеновских структур этих нанотрубок, взятых из баз данных, приведенных в работах [7, 8]). Таким образом, нами были получены две структуры ФФ-НТ L- и D-форм.

3D-модели использовались для построения цилиндрических проекций внутренней полости канала ФФ-НТ у соответствующих L- и D-форм.

Для целей этой работы мы генерировали два типа проекций: «гипсометрическую» [9], содержащую информацию о пространственном расположении видимых изнутри канала атомов, а также «идентификационную» [12], связывающую каждый пиксель проекции с его описанием в исходном PDB-файле и списком расстояний от центра каждого атома до оси проекционного цилиндра, рассчитанных при построении 3D-модели (рис. 2). Список расстояний и идентифицирующих каждый из спроецированных атомов цветов представляет собой таблицу, записанную в виде текстового файла, генерируемого при построении 3D-модели. В табл. 1 приведен фрагмент такого файла в качестве примера.

«Гипсометрические» проекции использовались для сравнительного визуального анализа структурных особенностей двух разных хиральностей. «Идентифицирующие» проекции использовались для сравнительного количественного анализа внутренней поверхности канала ФФ-НТ с точки зрения возможностей его гидратации. Данный метод можно рассматривать как грубый аналог метода расчета доступных растворяемости поверхностей [13].

Для получения количественных оценок был задействован программный пакет ImageJ v.1.52a [14]. С помощью разделения RGB-каналов и применения инструмента Threshold на «идентифици-

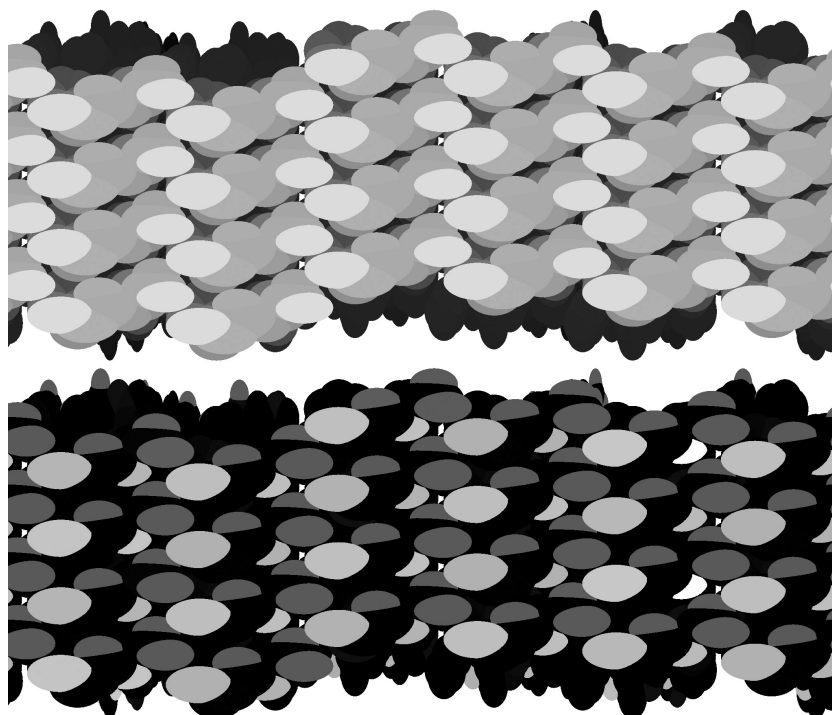


Рис. 2. Вид проекции внутренней поверхности канала D-формы ФФ-НТ, полученной с помощью 3D-модели, построенной из экспериментальных данных. Вверху – проекция, подобная «гипсометрической» карте. Светлые области обозначают большую высоту, т.е. близость к оси проекционного цилиндра и, следовательно, к центральной оси нанотрубки; темные области – максимальную удаленность от оси цилиндра/нанотрубки. Внизу – приведенная к монохромному виду проекция, идентифицирующая типы атомов. Черные области соответствуют атомам углерода, темно-серые – атомам кислорода, светло-серые – атомам азота.

Таблица 1. Фрагмент текстового файла, содержащего информацию, идентифицирующую атомы на проекциях посредством кодовых RGBA-цветов, а также значения расстояний от центра каждого атома до оси проекционного цилиндра

Красный (R)	Зеленый (G)	Синий (B)	Альфа (A)	Группа	Атом	Остаток	Расстояние, Å
0	0	16	255	grp: _17	atm: C_17	unt:	dst: 14.947566
0	0	17	255	grp: _18	atm: C_18	unt:	dst: 17.278604
0	64	224	255	grp: _19	atm: N_19	unt:	dst: 18.094639
0	64	225	255	grp: _20	atm: N_20	unt:	dst: 17.188943
192	0	0	255	grp: _21	atm: C_21	unt:	dst: 17.360572
192	0	1	255	grp: _22	atm: C_22	unt:	dst: 19.632428

Примечание. Комбинированное обозначение Residue name, Chain identifier, Residue sequence number в терминах спецификации Protein Data Bank Contents Guide v.3.30.

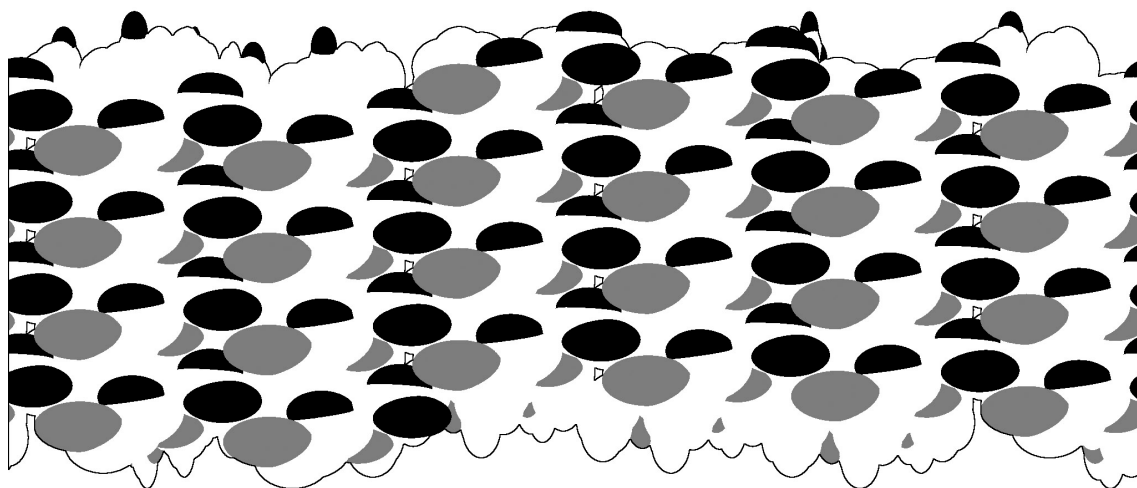


Рис. 3. Комбинированное отображение четырех масок D-формы ФФ-НТ, полученной из экспериментальных данных: проекции внутренней поверхности канала и промежутков между слоями (обозначены контурной линией), проекции атомов азота (обозначено серым цветом), проекции атомов кислорода (отображено черным).

рующей» проекции выделялись группы атомов азота и кислорода. Полученные с помощью такой декомпозиции изображения (рис. 3) использовались как графические файлы – маски в последующей композиции слоев, выполняемой в графическом редакторе Madichance PhotoReactor [15], а также для количественного анализа в программном пакете ImageJ.

Инструментом Analyze Particles подсчитывалась площадь (в квадратных пикселях) поверхности на проекции, занимаемая гидрофильными атомами (кислорода и азота). Для оценки промежутков между молекулярными группами использовался зеленый канал с выделением фоновых пикселей инструментом Threshold и подсчет «частиц» инструментом Analyze Particles с критерием 0–10000 пикс².

Для ряда таких вспомогательных операций, как, например, циклический сдвиг пикселей проекции вдоль осей *X* и *Y*, был задействован программный пакет G'MIC v.2.7.5 [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Визуальный анализ «гипсометрических» проекций, полученных на основе экспериментальных данных, определенно характеризует канал D-формы ФФ-НТ как более узкий, поскольку его гидрофильные атомы отображаются на проекции данного типа светло-серыми тонами, а на цветных проекциях – преобладанием в кодирующей расцветке красных оттенков у D-формы. Следовательно, эти атомы располагаются ближе к оси цилиндра/нанотрубки, а значит, сильнее «выпячиваются» во внутреннюю полость канала (рис. 4).

Канал ФФ-НТ L-формы напротив, более широкий, о чем свидетельствует преобладание зеленых оттенков на цветной проекции гидрофильных атомов и, соответственно, темно-серых тонов при монохромном представлении (рис. 4).

Вышеприведенные наблюдения подтверждаются расчетными данными. Так, внешний диаметр нанотрубки D-FF меньше на $2 \cdot (13.4062_{R(L-FF)} - 12.9915_{R(D-FF)}) \approx 0.83 \text{ \AA}$. Особый же интерес представляет характер распределения расстояний всех атомов у ФФ-НТ D- и L-форм, показанный на рис. 5.

Все вышеописанные наблюдения хорошо согласуются с результатами экспериментов и модельных расчетов, полученными в работах [7, 8] и свидетельствующими о более плотной упаковке самособранных D-FF-нанотрубок [1].

При этом нельзя не отметить очевидную симметрию в строении каналов обеих хиральных форм. Для наглядного подтверждения этого наблюдения мы совместили контурные изображения проекций гидрофильных атомов D- и L-форм ФФ-НТ, предварительно выполнив зеркальное отражение вокруг вертикальной оси у L-проекций и циклически сдвинув их на 17% относительно ширины изображения (рис. 6). Получившаяся иллюстрация наглядно демонстрирует структурное подобие каналов нанотрубок обеих хиральностей, но в то же время отчетливо свидетельствует и о наличии различий меньшего порядка в их геометрии.

Эти различия можно увидеть и на «гипсометрических» проекциях: в сравнении с проекцией D-формы L-проекцию поверхности внутренней полости канала ФФ-НТ можно охарактеризовать как более «рыхлую» и менее однородную, что проявляется в разнородном тонировании (а сле-

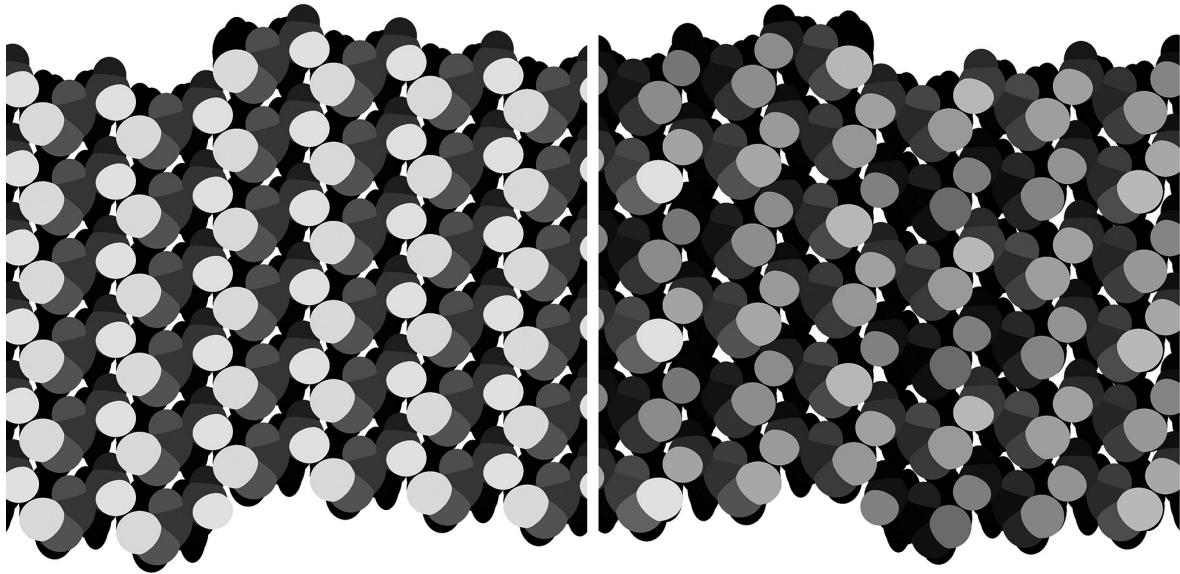


Рис. 4. «Гипсометрическое» представление проекций D-формы (слева) и L-формы (справа) ФФ-НТ.

довательно, и «разновысотности») гидрофильных атомов, направленных внутрь канала L-ФФ-НТ.

Для более формализованного описания как подобия, так и различий в структурах внутренней поверхности каналов D- и L-форм ФФ-НТ мы провели количественную оценку их проекций (табл. 2).

В соответствии с данными, приведенными в этой таблице, внутренние поверхности каналов ФФ-НТ обеих типов имеют практически одинаковые площади. При этом площади поверхностей, занимаемые проекциями гидрофильных атомов у каналов обеих структур, практически со-

поставимы – 53.773% у D-формы и 53.022% у L-формы. Одинаковым является и количество видимых на проекции гидрофильных атомов для каждой из хиральностей.

Несмотря на сопоставимую площадь «межатомных промежутков» на проекциях для D- и L-форм ФФ-НТ, количество их незначительно различается. Но наибольшее внимание обращает на себя явно различающаяся геометрическая форма проекцией этих пустот и распределение их размеров (площадей) (рис. 7).

Совершенно очевидно, что площади промежутков между проекциями атомов внутренней

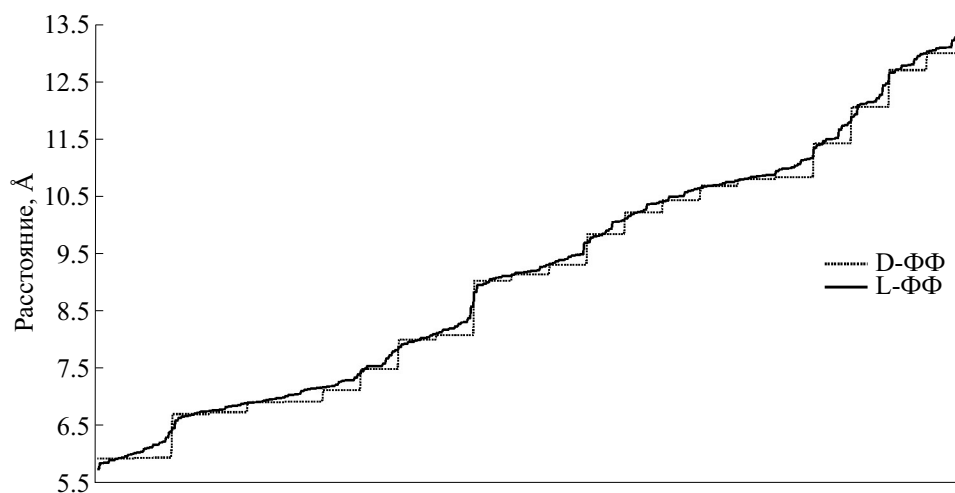


Рис. 5. Графическое представление распределения кратчайших расстояний от каждого атома до оси проекционного цилиндра. Пунктирная линия соответствует распределению у D-ФФ-НТ, сплошная – у L-ФФ-НТ.

Таблица 2. Результаты измерений проекций D-FF и L-FF

Форма ФФ-НТ	Поверхность канала		Кислород			Азот			«Просветы»		
	S , пикс ²	S , %	$n_{\text{атм}}$	S , пикс ²	S , %	$n_{\text{атм}}$	S , пикс ²	S , %	$n_{\text{пустот}}$	S , пикс ²	S , %
D-FF	3356647	80.029	108	978921	23.339 29.164	72	826052	19.695 24.609	90	88866	2.119 2.647
L-FF	3361090	80.135	108	963908	22.981 28.678	72	818226	19.508 24.344	88	91510	2.182 2.722

Примечание. В ячейках « S , %» первое значение – площадь, занимаемая проекциями объектов одного и того же типа (атомами или «промежутками»), выраженная в процентах от всей площади проекции (4194304 пикс²). Второе значение (выделено жирным шрифтом) – площадь на проекции, занимаемая объектами одного и того же типа (атомами или «промежутками»), выраженная в процентах от площади всей поверхности соответствующего канала. n – Количество видимых на проекции атомов.

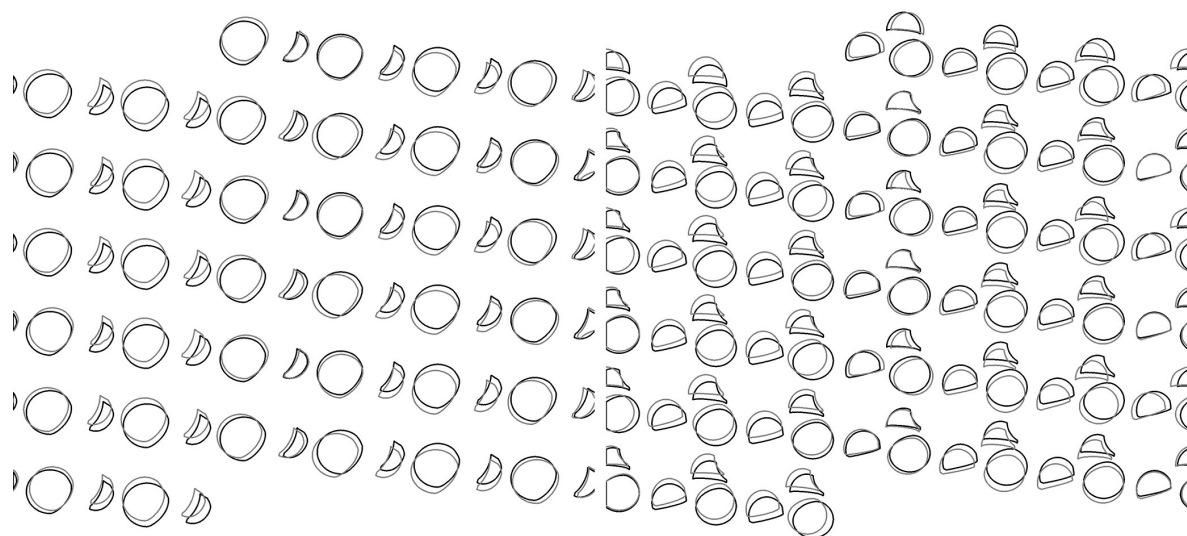


Рис. 6. Совмещенные контуры проекций атомов азота (слева) и кислорода (справа), локализованных на внутренних поверхностях каналов D-ФФ-НТ (показано черным цветом) и зеркально отраженной с циклическим сдвигом L-ФФ-НТ (показано серым цветом).

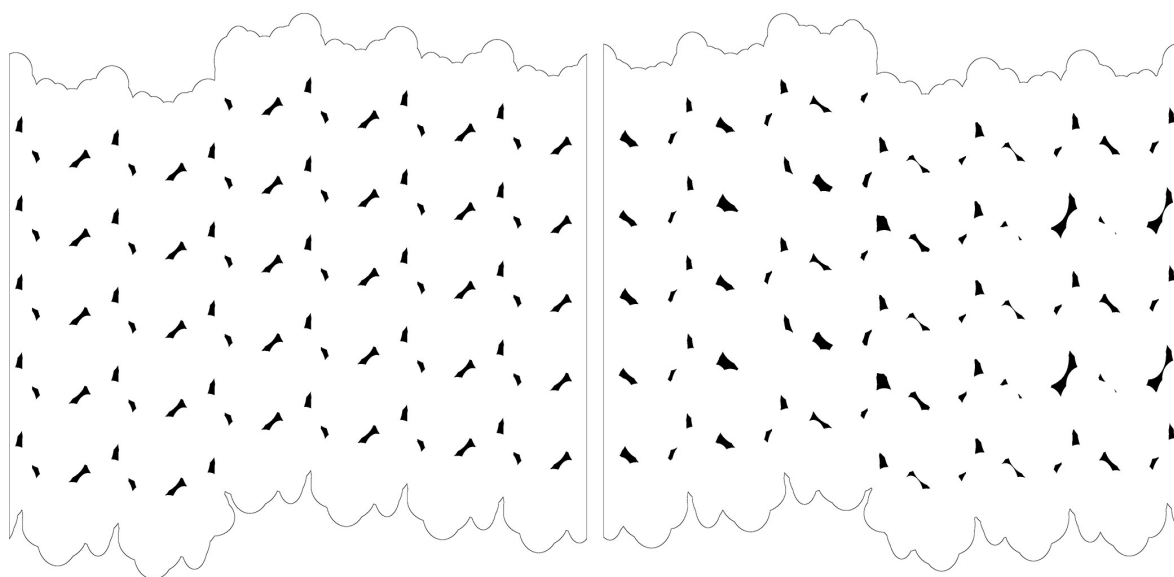


Рис. 7. Сравнительное отображение форм и размеров межатомных промежутков на проекциях внутренней поверхности каналов D-ФФ-НТ (слева) и L-ФФ-НТ (справа).

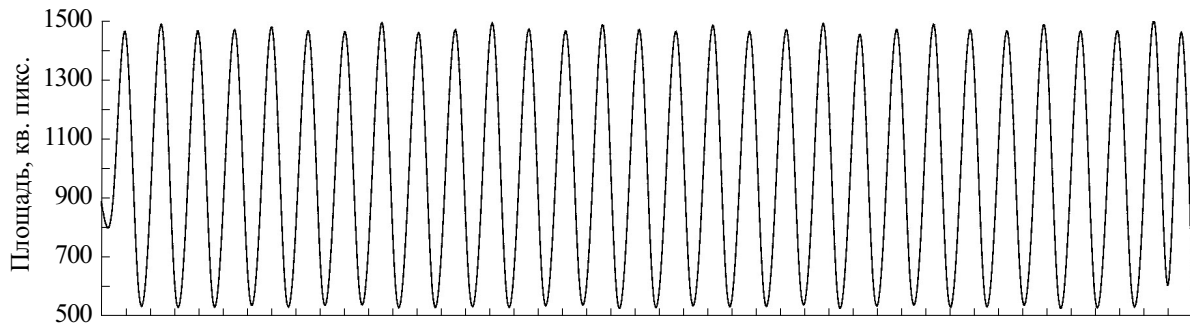


Рис. 8. Графическое представление распределения площадей промежутков между проекциями атомов внутренней поверхности канала ФФ-НТ у D-формы.

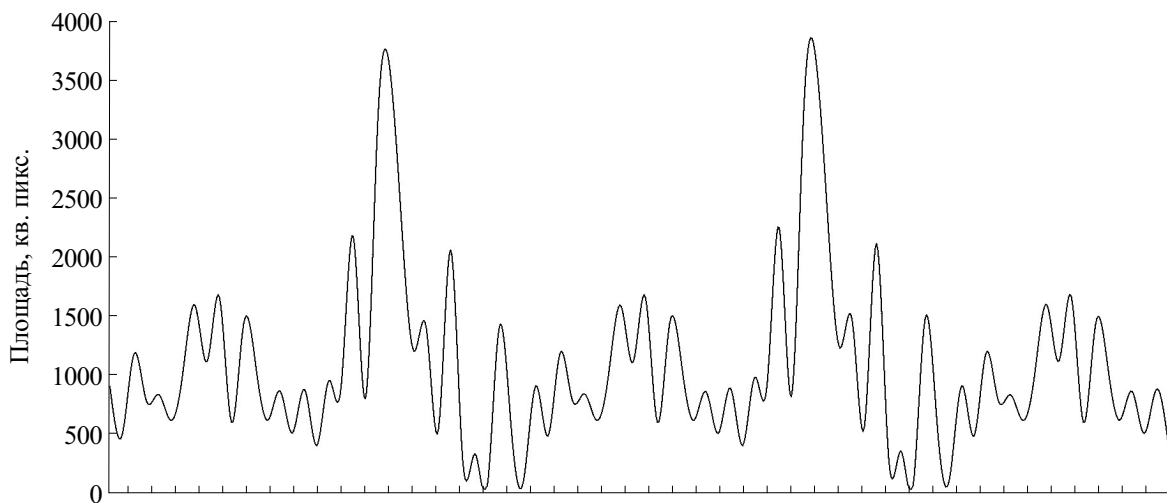


Рис. 9. Графическое представление распределения площадей промежутков между проекциями атомов внутренней поверхности канала ФФ-НТ у L-формы.

поверхности канала D-ФФ-НТ различаются гораздо меньше, чем те же объекты у L-ФФ-НТ. Закономерность распределения площадей таких промежутков при сканировании проекции в направлении «сверху-вниз» представлена на рис. 8 и 9.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные методом визуально-дифференциального анализа данные об особенностях структурной организации внутренних полостей двух хиральных форм дифенилаланиновых нанотрубок хорошо согласуются с данными, полученными рядом более консервативных методов, что подтверждает состоятельность предлагаемого нами метода анализа структурных особенностей ряда макромолекулярных структур.

Кроме того, при помощи нашего метода был получен ряд дополнительных данных, а также выявлен ряд закономерностей в структурной орга-

низации формально очень похожих структур, нуждающихся в дополнительных исследованиях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Теоретическая часть исследования была выполнена в рамках госзадания Министерства образования и науки Российской Федерации № 0017-2019-0009 (Институт прикладной математики им. М.В.Келдыша РАН) и № 01201373458. Апробация и реализация подхода были поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований, проекты 18-07-00354-а (С.В. Филиппов) и № 19-01-00519-а (В.С. Быстров).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. S. Zelenovskiy, A. S. Nuraeva, S. Kopyl, et al., *Crystal Growth & Design* **19**, 6414 (2019). DOI: 10.1021/acs.cgd.9b00884.
2. R. F. Silva, D. R. Araújo, E. R. Silva, et al., *Langmuir* **29** (32), 10205 (2013).
3. A. Bonetti, S. Pellegrino, P. Das, et al., *Org. Lett.* **17** (18), 4468 (2015).
4. G. Emtiazi, T. Zohrabi, L. Y. Lee, et al., *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **41**, 90 (2017).
5. В. А. Твердислов, Е. В. Малышко, С. А. Ильченко и др., *Биофизика* **62** (3), 421 (2017).
6. В. И. Тишков, *Вестню МГУ. Сер. 2. Химия* **43** (6), 381 (2002).
7. V. S. Bystrov, P. S. Zelenovskiy, A. S. Nuraeva, et al., *J. Mol. Model.* **25**, Art. numb. 199 (2019). DOI: 10.1007/s00894-019-4080-x
8. V. S. Bystrov, P. S. Zelenovskiy, A. S. Nuraeva, et al., *Math. Biol. Bioinform.* **14** (1), 94 (2019). DOI: 10.17537/2019.14
9. С. В. Филиппов, Р. В. Полозов и В. С. Сивожелезов, *Визуализация пространственных структур (био)макромолекул в виде подобных гипсометрическим карт* (Препринт № 61, ИПМ им. М.В. Келдыша, М., 2019). DOI: 10.20948/prepr-2019-61. URL: https://keldysh.ru/papers/2019/prep2019_61.pdf.
10. С. В. Филиппов, *Программная платформа Blender как среда моделирования объектов и процессов естественно-научных дисциплин* (Препринт № 230, ИПМ им. М.В. Келдыша, 2018). DOI: 10.20948/prepr-2018-230. URL: http://keldysh.ru/papers/2018/prep2018_230.pdf.
11. С. В. Филиппов и В. С. Сивожелезов, в сб. *Докл. междунар. конф. «Математическая биология и биоинформатика»*, под ред. В. Д. Лахно (ИМПБ РАН, Пушкино, 2018), т. 7, статья № е45. DOI: 10.17537/icmbb18.23
12. С. В. Филиппов, *Метод идентификации атомов макромолекул, визуализируемых в 3D редакторах* (Препринты № 97, ИПМ им. М.В. Келдыша, 2019). DOI: 10.20948/prepr-2019-97. URL: https://keldysh.ru/papers/2019/prep2019_97.pdf.
13. B. Lee and F. Richards, *J. Mol. Biol.* **55**, 379 (1971). DOI: 10.1016/0022-2836(71)90324-X
14. C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, *Nature Methods* **9** (7), 671 (2012).
15. Photo Reactor – Nodal Image Processor. URL: <https://www.mediachance.com/reactor/index.html>.
16. G'MIC is a full-featured open-source framework for digital image processing. URL: <https://gmic.eu> (дата обращения: 28.11.2019).

Visual-Differential Analysis of Structural Features of Internal Cavities of Two Chiral Forms of Diphenylalanine Nanotubes

S.V. Filippov and V.S. Bystrov

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

With an original method for visual-differential analysis of the conformational features of (bio)macromolecular structures, a theoretical study concerned with the differences in the structural organization of diphenylalanine nanotubes of D- and L-chiral forms was carried out. The general features of spatial organization of the inner surface of nanotube channels are described: the mirror images of hydrophilic atoms and equal areas of their projections indicate that hydration of the internal cavities of the channels of diphenylalanine nanotubes of D- and L-chiralities is of similar nature. Minor differences were revealed: the large size of the channel cavity in L-shaped nanotubes, as well as the greater uniformity in the stacking of diphenylalanine layers in the D-shaped. The obtained results correlate with experimental data.

Keywords: nanotubes, diphenylalanine, Blender, ImageJ, hypsometric projections