

АЛАНИН: ОБЫЧНОЕ И НЕОЖИДАННОЕ

© 2023 г. В.Г. Туманян^{*,#}, А.А. Анашкина^{*}, И.В. Филатов^{**}, К.В. Смирнов^{*},
И.Ю. Торшин^{***}, Н.Г. Есипова^{*}

^{*}Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, ул. Вавилова, 32, Москва, 119991, Россия

^{**}Московский физико-технический институт,

Институтский пер., 9, Долгопрудный Московской области, 141700, Россия

^{***}Вычислительный центр им. А.А. Дородницына Федерального исследовательского центра
«Информатика и управление» РАН, ул. Вавилова, 40, Москва, 119333, Россия

[#]E-mail: vgt450@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.11.2022 г.

После доработки 11.12.2022 г.

Принята к публикации 14.12.2022 г.

На основании экспериментальных данных можно говорить об аномально большом вкладе аланина в стабилизацию альфа-спирали и других белковых конформаций. Независимые (в том числе экспериментальные) данные свидетельствуют об особо большом вкладе аланина в стабилизацию альфа-спирали. При этом выявляются позитивные вклады, как в энтропию системы, так и в энтальпию. Высокий вклад аланина в энтальпию образования альфа-спирали противоречит общепринятому взгляду: энтропия должна падать при образовании регулярных структур в белках. Аланин стабилизирует два типа вторичной структуры из трех: альфа-спираль и левую спираль типа «полипролин II», а если говорить о фибриллярных белках, то аланин стабилизирует и бета-структуру. Стабилизирующий эффект аланина на структуру альфа-спирали распространяется и на нативно-развернутые белки, и на конъюгаты «альфа-спираль–подложка». Словом, не будет преувеличением сказать, что проблема формирования вторичной структуры белка сводится к проблеме аланина. Вскрытые противоречия носят парадоксальный характер и их интерпретация (прежде всего, обоснование вклада аланина в энтальпию плавления в терминах фундаментальной физики) на сегодняшний день отсутствует. Между тем представленные в работе данные и комментарии позволяют надеяться на прогресс в разрешении выявленных противоречий.

Ключевые слова: аланин, конформационно стабильные/лабильные сегменты белка, локальная структура белка, конформационный анализ, статистический анализ, ЯМР, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0006302923020011, EDN: BZIYRK

Если задаться вопросом, какая аминокислота может рассматриваться как самый типичный представитель соответствующего класса соединений, отражающий свойства других аминокислот (здесь и далее мы имеем в виду так называемые кодируемые аминокислоты), то ответ может быть только один: аланин. Действительно, аланин имеет простое химическое строение, но сохраняет ряд свойств более сложных аминокислот. Проще аланина только глицин, но глицин вообще представляет собой исключение — это единственная ахиральная аминокислота из общего списка из 20 аминокислот.

Чтобы охарактеризовать вовлеченность аланина в науку и технику приведем только по одному примеру из области медицины и технологии.

Уже то, что аланин влияет на уровень сахара в крови, позволяет предположить, что он может найти применение в медицине. И действительно,

несмотря на простоту химической формулы, аланин эффективен в качестве лекарства и прописывается как средство от дегидратации при диарее, при гипертрофии предстательной железы, при стрессе, шизофрении и т.д. (см. <https://www.drug-bank.ca/drugs/DB00160>). Хотя спектр применения его в качестве лекарственного средства достаточно широк, почти нет данных о механизмах, стоящих за терапевтическим эффектом аланина.

В качестве примера применения аланина в области материаловедения можно привести связанную с проблемой защиты окружающей среды работу [1], в которой показано, что аланин может окислять оксид графена без катализатора или использования щелочной среды.

Физико-химические свойства аланина не носят крайнего характера; в группе гидрофобных алифатических аминокислот (Ala, Val, Leu, Ile) аланин, имея в качестве бокового радикала ме-

тильную группу, обладает наименьшей гидрофобностью и наибольшей растворимостью. Аланин широко распространен в белках, и во многих белках это наиболее представленная аминокислота. Это наиболее, если можно так выразиться, замещающая и замещаемая аминокислота. Согласно генетическим данным по аминокислотным заменам аланин относится к наиболее легко заменяемым аминокислотам, он делит второе и третье места по «заменимости». Другими словами, это наиболее толерантная к заменам аминокислота [2]. На первом месте находится метионин, содержание которого всегда незначительно, а на последнем (максимальная незаменимость) — пролин.

Ввиду перечисленных свойств аланина использование этой аминокислоты в качестве модели в теоретических и экспериментальных исследованиях представляется наилучшим выбором, можно привести многочисленные примеры работ такого плана.

Так, аланин часто используют как упрощенную модель других аминокислот (кроме глицина). В экспериментах «host-guest» он может выполнять как роль «гостя», так и «хозяина».

Замены на аланин, как правило, ведут к повышению стабильности альфа-спиральных host-пептидов.

Наконец, широко востребована процедура аланинового сканирования: в экспериментальном варианте и в варианте *in silico*, когда аминокислоты в цепи белка с первой до последней замещаются на аланин. Оба варианта, экспериментальный и расчетный, дополняют друг друга.

Все эти процедуры не свободны от эффекта контекста. Типичным примером может служить работа [3], в которой содержание альфа-спирали в пептиде-хозяине оценивалось спектроскопическими методами при замещениях на все 20 аминокислот (гость) и при этом учитывался контекст. Оценка свободной энергии позволила авторам прийти к выводу (не бесспорному), что только Ala и Glu доказательно являются спираль-стабилизирующими, тогда как все остальные боковые цепи являются нейтральными или дестабилизирующими.

Тем более неожиданными представляются обнаруженные в результате исследований факты, которые не вяжутся с ролью аланина как некоего среднего представителя аминокислотного ряда, факты, которые не согласуются с данными о структуре и свойствах этой молекулы.

Соответствующие данные, представляющиеся неожиданными, могут быть объединены под общей рубрикой: стабилизирующий вклад аланина. При этом речь идет о стабилизации альфа-спирали и левой спирали типа «полипролин II», а в ва-

рианте фибриллярных белков аланин способствует формированию также и бета-структуры.

Аномалия аланина всплывает уже при анализе обобщающих обширную экспериментальную информацию данных по статистике расстояний C α —C α , используемых с целью построения knowledge-based потенциалов. Эти данные позволяют обнаружить, что взаимодействия между C α -атомами аланинов особенно велики [4].

СТАБИЛИЗАЦИЯ АЛЬФА-СПИРАЛИ ПО ДАННЫМ БИОИНФОРМАТИКИ

Методы биоинформатики, носящие как правило статистический характер, позволяют обнаружить определенные закономерности, например, найти, какие остатки стабилизируют или дестабилизируют вторичную или локальную структуру белка. Далее в лучшем случае полученные тенденции интерпретируются исходя из представлений физической химии и молекулярной биофизики, а обычно остаются просто средством для предсказаний.

Что касается данных по аминокислотному составу, то обширный статистический материал свидетельствует о том, что остатки MALEK имеют предпочтение для вхождения в альфа-спираль и полипептидная цепь в местах скопления этих остатков с большой вероятностью примет структуру альфа-спирали.

Можно считать, что наибольший спираль-образующий вклад вносит аланин. Большой вклад можно приписать только метионину, но метионин находится среди наиболее редко встречающихся аминокислот (тогда как аланин — среди самых распространенных). Поэтому вряд ли имеет смысл говорить о заметной суммарной стабилизирующей роли метионина.

Аминокислоты, избегающие альфа-спираль, — это Pro и Ser. Обращает на себя внимание то, что в группу стабилизирующих альфа-спираль аминокислот входят остатки, не имеющие ничего общего в их структуре и свойствах. Действительно, E и K несут заряд разного знака, A, M и L вообще не имеют заряда и сильно различаются друг от друга. Невозможно, по крайней мере, на первый взгляд, найти общее свойство этих остатков, которое можно было бы считать ответственным за формирование и/или стабилизацию альфа-спирали, да и вообще найти общее свойство этих остатков. Более того, объяснить способность образовывать спираль трудно даже для отдельных остатков из этой группы и, пожалуй, особенно трудно это сделать для аланина.

В попытках объяснения свойств аланина самое естественное начать со свойств СН₃-группы. Поскольку боковая цепь аланина представляет собой метильную группу, в этом случае боковой

радикал имеет самый простой набор конформеров (+гош-, –гош- и транс-конформеры). Представляется естественным соотносить свойства SH_3 -группы со свойствами всей аминокислоты, тем более, что метильная группа сама по себе обладает целым набором оригинальных свойств. Так, существенная разница в динамике нуклеиновых кислот и белков, как полагают, обусловлена свойствами метильных групп при почти полном отсутствии таковых в нуклеиновых кислотах и большом их содержании в белках. По мнению авторов работы [5] метильная группа служит пластификатором и обеспечивает молекулярную гибкость. Метильные группы в ряде ферментов располагаются вокруг таких центров динамики как гибкие шарниры или активные центры. Эти группы нельзя игнорировать при рассмотрении таких явлений как гидрофобность, фолдинг, энтропия. Авторы работы [5] полагают, что может иметь место отбор числа и положения метильных групп в ходе эволюции биополимеров, что, на наш взгляд, представляется спорным. Что бесспорно, так это вовлеченность метильных групп в процессы гидратации и дегидратации. В белках динамика строго координирована с растворителем.

Оригинальные свойства аланина в аспекте гидратации привлекают специалистов, владеющих самыми современными методами исследования. Так, ячейка гидратации аланина была промоделирована с использованием квантовой молекулярной динамики [6], что позволило исследовать тонкие эффекты в ЯМР-химических сдвигах и не прямых спин-спиновых парных констант для разных ионных форм этого соединения. Обнаружено существенное различие в радиальных и угловых распределениях молекул воды вокруг растворенного вещества. Авторы работы [6] утверждают, что использование столь сложных методов является необходимым для исследования не только свойств молекулы, но и ее взаимодействия с окружающей средой, включая растворитель и подложку.

Интересно, что аланин стабилизирует конформацию типа «полипролин II» также и в так называемых развернутых или неупорядоченных белках, что убедительно доказано в работе [7]. Между тем, свойства других аминокислот в нативной глобуле и в развернутом состоянии могут существенно различаться. Таким образом, эти белки не столь уж неупорядоченные, если принять во внимание превалирование конформации типа «полипролин II», особенно в присутствии в первичной структуре аланина.

Это постоянство в оригинальном свойстве проявляется не только в одинаковом эффекте аланина в обычных и развернутых белках, но и, например, при сравнении его действия в стан-

дартных альфа-спиралях и в конъюгатах «подложка–пептид» что позволяет, как утверждают авторы работы [8], говорить о внутренне присущей этой аминокислоте спираль-образующей тенденции.

Особую роль при исследованиях таких подвижных групп, как SH_3 -группа, очевидно, играет метод ЯМР. Работа [9] дает представление о тенденциях в исследованиях белков методом ЯМР-спектроскопии. На примере SH_3 -домена альфа-спектрина авторы оценили энергию активации барьеров вращения метильных групп. Для 33 метильных групп SH_3 -домена средняя высота барьера составила 0.9 ккал/моль. Эта величина варьирует, в соответствии с моделью «жидкой» гидрофобной сердцевины белка, в зависимости от контактов с окружающими атомами. Но порядок, который привел бы к систематическому повышению (понижению) барьеров, отсутствует. Для сравнения: молекулярная динамика приводит к величине барьера от 3.1 до 3.5 ккал/моль. Иногда изменение высоты барьера связано со слишком быстрым «отжигом» к температуре 0 К. В нескольких случаях барьеры выше 10 ккал/моль служат индикатором возмущения ван-дер-ваальсовых контактов. Авторы констатируют, что таким образом может быть проложен мостик между структурными и динамическими исследованиями.

МИКРОКАЛОРИМЕТРИЯ

Теперь мы подходим к самой важной информации – результатам физических экспериментов. С помощью прямых определений термодинамических параметров методом микрокалориметрии был оценен вклад аланина в энтальпию перехода «спираль–клубок» в альфа-спирали по сравнению с другими аминокислотными остатками (разумеется, при нормировании на количество атомов в остатке). Был обнаружен аномально большой вклад аланина в энтальпию плавления альфа-спирального пептида, а также в энтропию.

Высокий вклад аланина в энтальпию образования альфа-спирали противоречит общепринятому взгляду, согласно которому энтропия должна падать при образовании регулярных структур в белках. Остановимся на этом моменте более подробно.

Как известно, различные аминокислотные остатки по-разному влияют на термодинамическую стабильность альфа-спирали, что объясняется различием в потере конфигурационной энтропии боковой цепи при образовании спирали. В работе [10] на основании калориметрических результатов для двенадцати пептидов было обнаружено, что имеют место существенные различия в энтальпии перехода «спираль–клубок» для раз-

личных аминокислотных остатков. Конечно, тот факт, что остатки аланина влияют на стабильность альфа-спирали, был известен достаточно давно [11], но важны количественные оценки. Аланин в альфа-спирали стабилизирует спираль по сравнению с Gly на $0.4 - 2.0$ ккал/моль.

Как отмечают многие авторы, аланин благоприятным в смысле свободной энергии образом встраивается в альфа-спираль из-за энтропийного фактора. Действительно, для других аминокислот (кроме пролина и глицина) вхождение в альфа-спираль означает ограничение более или менее свободного вращения бокового радикала в конформации клубка. По реалистичным оценкам, потеря конформационной энтропии, препятствующая вхождению боковой цепи в альфа-спираль, соответствует в среднем 1.11 ккал/моль⁻¹. Для аланина эта потеря, естественно, отсутствует. Как ротамерное напряжение, так и χ -напряжение для аланина равны нулю, что является дополнительным к энтропийному фактором, способствующим формированию альфа-спирали аланин-содержащими цепями, и суммарный эффективный выигрыш для аланина по сравнению с другими аминокислотами составляет 1.08 ккал/моль⁻¹, если принять оценки, приведенные в работе [12].

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Какие же объяснения доминирующей роли аланина в формировании альфа-спирали можно представить с точки зрения современной физико-химии белка?

Прежде всего, трудно говорить о стабилизирующих ван-дер-ваальсовых контактах остатка аланина с атомами остова полипептидной цепи. Взаимодействия типа «остаток—остаток» для аланина весьма редки, а на участках скопления аланинов исключены, между тем, эффект аланина носит аддитивный характер. Точно также трудно делать выводы о благоприятном вкладе электростатики, поскольку парциальные заряды на атомах водородов метильной группы весьма малы. Очевидно, что исключены и водородные связи. Исследователи, изучающие роль квантово-химических эффектов для разных конформаций остова полипептидной цепи, не отмечают каких-либо особенностей, связанных с аланином. Наконец, трудно привлечь для объяснения роли аланина данные о гидратации альфа-спирали. Учитывая внешнее расположение остатка аланина в альфа-спирали и скорее гидрофобный характер этого остатка, нет оснований предполагать существенную разницу в характере гидратации аланина в альфа-спирали и в денатурированной форме белка. Последнее, что можно представить, — это быстрое вращение CH_3 -группы, детектируемое

методом ЯМР, что, безусловно, влияет на гидратацию и динамику.

В свете вышеизложенного мы приходим к заключению о необходимости дальнейшего выяснения роли аланина в контексте структуры, свойств и функции белка, при этом немалую роль играет переосмысление полученных ранее данных. Вскрытые противоречия носят парадоксальный характер и их интерпретация (прежде всего, обоснование вклада аланина в энтальпию плавления в терминах фундаментальной физики) на сегодняшний день отсутствует. Между тем представленные в работе данные и комментарии позволяют надеяться на прогресс в разрешении выявленных противоречий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основной результат работы заключается в демонстрации уникальных свойств аланина в контексте участия этой аминокислоты в структурообразовании белков и стабилизации их структуры.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00936).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Wang, E. C. Salihi, and L. Šiller, *Mater. Sci. Engin.*, **72** (2), 1 (2017).
2. V. E. Gray, R. J. Hause, and D. M. Fowler, *Genetics*, **207**, 53 (2017).
3. J. Yang, E. J. Spek, Y. Gong, et al., *Prot. Sci.*, **6**, 1264 (1997).
4. Y. Wu, M. Lu, M. Chen, et al., *Prot. Sci.*, **16**, 1449 (2007).
5. J. D. Nickels, J. E. Curtis, H. O'Neill, and A. P. Sokolov, *J. Biol. Phys.*, **38**, 497 (2012).
6. M. Dracinsky, J. Kaminsky, and P. Bour, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 14698 (2009).
7. S. Toal and R. Schweitzer-Stenner, *Biomolecules*, **4**, 725 (2014).
8. C. A. Rohl, W. Fiori, and R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3682 (1999).

9. Y. Xue, M. S. Pavlova, Y. E. Ryabov, et al., J. Am. Chem. Soc., **129**, 6827 (2007).
10. J. M. Richardson, M. M. Lopez, and G. I. Makhata-dze, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102** (5), 1413 (2005).
11. L. Serrano, J. L. Neira, J. Sancho, and A. R. Fersht, Nature, **356** (6368), 453 (1992).
12. S. Penel and A. J. Doig, J. Mol. Biol., **305** (4), 961 (2001).

Alanine: from the Usual to the Unexpected

V.G. Tumanyan*, A.A. Anashkina*, I.V. Filatov, K.V. Smirnov*,
I.Yu. Torshin***, and N.G. Esipova***

**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

***Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia*

****Dorodnicyn Computing Centre, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 40, Moscow, 119333 Russia*

Data from the experiments provides a possibility to talk about anomalously large contribution of alanine to the stability of an α -helix and other protein conformations. Independent data (and also experimental ones) suggest that alanine plays an especially big role in stabilization of the α -helix. This can be seen through the positive contribution of alanine both to the entropy of the system and to the enthalpy. The high contribution of alanine to the enthalpy of formation of the α helix contradicts the generally accepted view that the entropy should decrease during the formation of regular structures in proteins. Among three types of helices in proteins, alanine stabilizes two secondary structures: the α helix and the left helix of polyproline II, and in the case of fibrillar proteins, alanine also stabilizes the β sheet. The stabilizing effect of alanine on the α helix structure extends to both natively unfolded proteins and α helix–support conjugates. Thus, it is no exaggeration to say that formation of secondary structure relies on alanine. The revealed contradictions are of paradoxical nature and yet there is no interpretation of the above-mentioned findings (first of all, substantiation of the contribution of alanine to the enthalpy of fusion in terms of fundamental physics) so far to resolve them. Meanwhile, the data and comments presented in this work hold out the promise of progress in resolving the revealed contradictions.

Keywords: alanine, conformationally stable/labile protein segments, local protein structure, conformational analysis, statistical analysis, NMR, molecular dynamics