

ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров

Направление «Физика»

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОЛИАСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ВОДНЫХ
РАСТВОРАХ МИНЕРАЛЬНЫХ СОЛЕЙ**



Бакалаврская работа студента

_____ **Бойко Оксаны Сергеевны**

Научный руководитель:

_____ д. ф.-м. н., проф. РАН **С.В. Люлин**

Санкт-Петербург

2017

Оглавление

Введение	3
<i>Полиаспарагиновая кислота и полимериндуцированная минерализация</i>	3
<i>Влияние ионов на конформацию полиэлектролита</i>	4
<i>Выбор силового поля</i>	11
Модели и метод	12
Результаты моделирования	15
<i>Размеры цепочки PAsp в растворах хлорида кальция</i>	16
<i>Распределение ионов кальция вблизи карбоксильных групп PAsp</i>	18
<i>Конформация цепочки PAsp</i>	23
Заключение	26
Список литературы	27

Введение

Полиаспарагиновая кислота и полимериндуцированная минерализация

Полиаспарагиновая кислота (PAsp) (рис. 1) – это полипептид, представляющий собой многофункциональный биополимер, широко применяемый в водных фильтрах [1], в составе медицинских препаратов [2] и антикоррозионных средств [3]. Наибольший интерес к PAsp связан с возможностью ее использования в области тканевой инженерии при синтезе костных имплантатов [4].

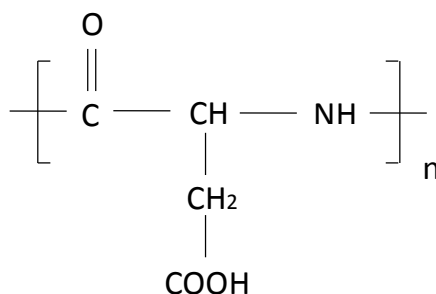


Рисунок 1. Химическая формула мономера PAsp.

Органоминеральные композиты являются перспективными для создания костных имплантатов, поскольку они по своему составу имитируют костную ткань. Одним из способов синтеза органоминеральных композитов является метод полимериндуцированной минерализации, основывающийся на тех же принципах, которые реализуются в организме. Суть этого метода заключается в том, что минерализация органической матрицы осуществляется в присутствии полимерного агента в растворах кальция содержащих солей, имитирующих минеральный состав тканевой жидкости. Считается, что полимерный агент захватывает ионы, формируя “жидкоподобную” минеральную фазу, которая потом в результате электростатических взаимодействий и капиллярных эффектов доставляется на поверхность и, что важно, в полости органической матрицы, где впоследствии кристаллизуется. Таким образом, формируется

материал, по структуре схожий с костной тканью, в которой минеральные кристаллы заполняют все полости коллагеновой матрицы.

РАsp является полимером с полностью ионизирующимися в чистой воде (при pH=7) карбоксильными группами [5]. Благодаря этому РАsp может адсорбировать ионы из раствора минеральных солей в результате ион-ионных взаимодействий между минеральными ионами и заряженными боковыми группами. Кроме того, РАsp является биосовместимым и биodeградируемым полимером и поэтому является одним из претендентов на роль полимерного агента в минерализации. Для перечисленных выше целей могут использоваться и другие полиэлектролиты, например, полиакриловая (рис. 2а) и полиглутаминовая кислоты (PGA) (рис. 2б). Но благодаря биосовместимости и возможности синтеза в промышленных масштабах РАsp и PGA являются более подходящими полимерными агентами для синтеза костных имплантатов методом полимериндуцированной минерализации. В работе [6] было показано, что при минерализации с использованием РАsp и комбинаций РАsp с PGA минеральные вещества глубоко проникают в полости матрицы, что приводит к высокой степени минерализации синтезируемых композитов.

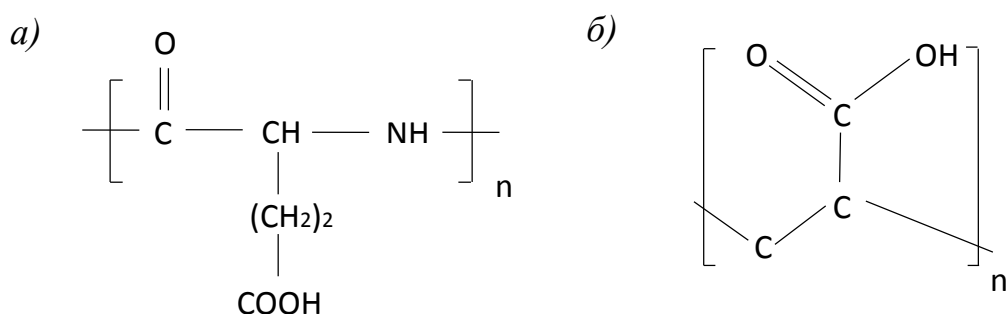


Рисунок 2. Химические формулы мономеров а) полиглутаминовой и б) полиакриловой кислот.

Влияние ионов на конформацию полиэлектролита

Для понимания процессов, происходящих при синтезе органоминерального композита, прежде всего, необходимо исследовать поведение полимерного агента в водном растворе кальций содержащих солей и

в первую очередь влияние многовалентных ионов на его конформацию, что и является целью данной работы.

В работе [7], используя теоретические подходы, авторами было показано, что в растворах двухвалентной соли возможна полная компенсация заряда на цепи полиэлектролита, что приводит к уменьшению размеров макромолекулы за счет ослабления электростатического отталкивания между мономерами.

Существующие теоретические работы (например, [7,8]) позволяют описывать системы с низкими концентрациями соли, что не подходит для анализа исследуемых систем, поскольку при синтезе композиционных материалов биоимитационным методом используются высокие концентрации соли [9,4,6,10–12].

Процессы полимериндуцированной минерализации активно изучаются с использованием экспериментальных методов в течение последних пятнадцати лет [9,4,6,10–12]. Синтез композиционных материалов проводился с использованием различных полимерных агентов [6,10]. Методами рентгеноструктурного анализа [9,6,11,12], сканирующей и просвечивающей электронной [9,6,10–12], рамановской [10], световой и поляризационной оптической [10] микроскопии, а также с помощью термогравиметрического и дифференциального термического анализа [9,6,11] изучались формирующиеся композиционные материалы. Первоочередной задачей перечисленных работ являлось исследование структуры полученного композитного материала и выяснение условий, при которых минеральная фаза заполняет полости органической матрицы. Важно отметить, что существующие экспериментальные исследования дают в основном косвенную информацию о молекулярных механизмах минерализации. Изучить явления и эффекты, происходящие в системе в процессе образования органоминерального композита на молекулярном уровне, возможно, используя компьютерное моделирование.

Так, например, в работе [13] с помощью крупнозернистого моделирования, то есть моделирования с использованием моделей, в которых каждая движущаяся частица описывает группу атомов реальной молекулы, были

исследованы системы с высокими концентрациями солей и определен общий характер влияния многовалентных ионов соли на конформацию и размеры полиэлектролитных молекул различной гибкости. Как видно из рис. 3, при низких концентрациях соли полугибкий полиэлектролит (к которому относится PAsp) характеризуется вытянутой конформацией, поскольку заряд на цепи полиэлектролита не скомпенсирован. При увеличении концентрации соли заряд на цепочке нейтрализуется противоионами, что обуславливает уменьшение ее размеров в результате ослабления электростатического отталкивания между мономерами. Последующее увеличение концентрации соли приводит к инверсии заряда, и, как следствие, к отталкиванию между мономерами и увеличению размеров полиэлектролита.

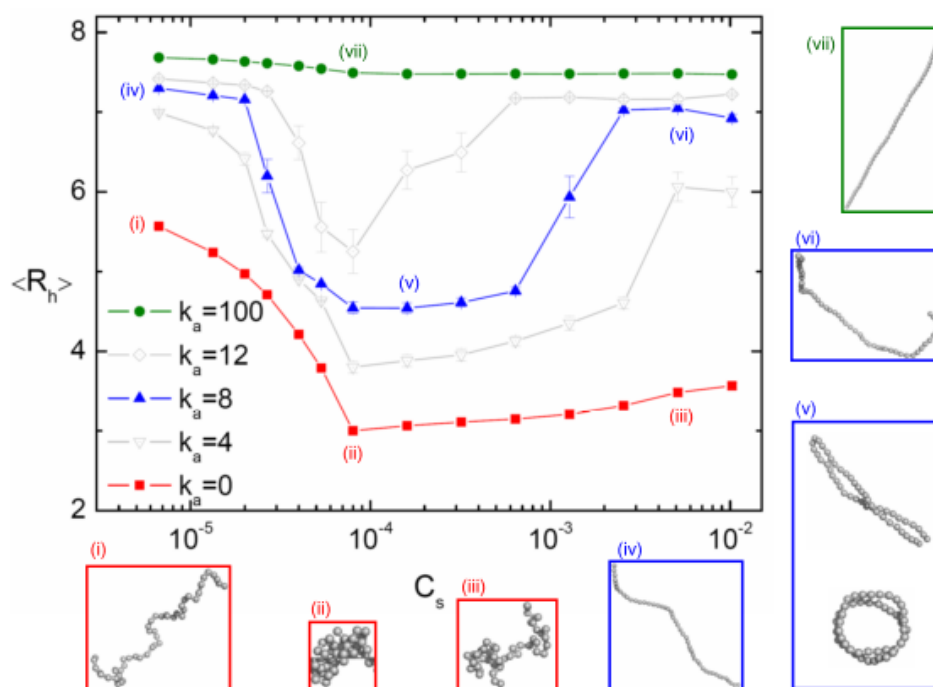


Рисунок 3. Зависимость гидродинамического радиуса полиэлектролита $\langle R_h \rangle$ от концентрации соли C_s для цепей с различными параметрами жесткости k_a и мгновенные рисунки типичных структур в точках (i) – (vii) [13].

Крупнозернистое моделирование цепи полиэлектролита в солевом растворе позволяет исследовать системы с высокими концентрациями солей, но не учитывает химическую структуру полимера и специфические

взаимодействия, такие как водородные связи и ион-дипольные взаимодействия. Полноатомное компьютерное моделирование позволяет учесть эти факторы и дает возможность получить информацию о влиянии минеральных ионов на конформацию конкретного полимера. Так, в работе [14] проводилось моделирование PAsp в воде в протонированном и депротонированном состоянии. Было показано, что депротонирование PAsp сопровождается значительным увеличением размеров цепи.

На сегодняшний день нам неизвестны работы, посвященные полноатомному моделированию PAsp в водных растворах минеральных солей. Тем не менее, существуют работы по полноатомному моделированию PGA в солевом растворе [15,16]. Поскольку различия в химической структуре PGA и PAsp (рис. 1, 2а) не велики, влияние минеральных ионов на конформацию цепи должно быть аналогичным. В работах [15,16] было показано, что добавление одновалентной соли (NaCl) приводит к изменению конформации PGA (рис. 4). При этом было выяснено [16], что добавление другой одновалентной соли (KCl) не оказывает такого влияния (рис. 4). По мнению авторов [16], причина этого заключается в различиях параметров взаимодействия Ван-дер-Ваальса ионов Na⁺ и K⁺ (таблица 1). Взаимодействия Ван-дер-Ваальса принято описывать с помощью потенциала Леннард-Джонса:

$$U_{LJ} = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

где ε – энергия взаимодействия, σ – расстояние, на котором энергия взаимодействия становится равной нулю, r – расстояние между атомами.

Таблица 1. Параметры взаимодействий Ван-дер-Ваальса ионов Na⁺ и K⁺ в силовом поле OPLS-AA [16].

ион	σ , Å	ε , кДж/моль
Na ⁺	1.89744	6.7287
K ⁺	4.93463	1.3733e-03

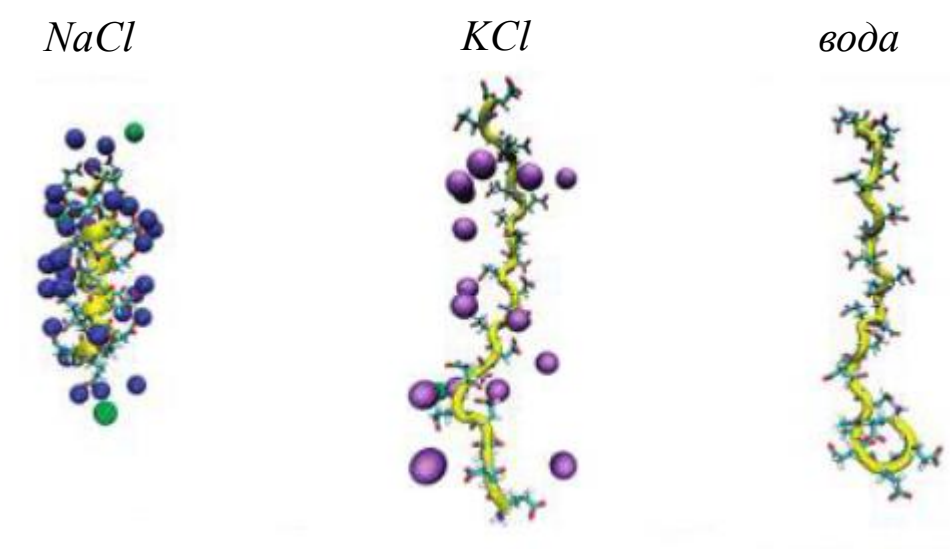


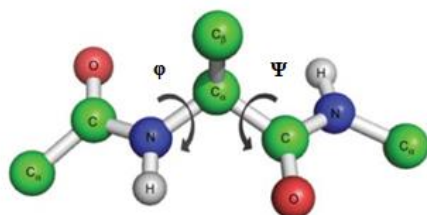
Рисунок 4. Наглядное представление изменения конформации PGA при добавлении хлорида натрия и хлорида калия в водное окружение [16].

С другой стороны, экспериментальные исследования PGA методами рамановской спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма [17] показывают, что изменение конформации PGA является незначительным как при добавлении соли NaCl, так и соли KCl.

Для описания конформации и пространственной структуры белковых молекул и аминокислот принято использовать распределение двугранных углов ϕ и ψ (рис. 5а), предложенное в работе [18] и называемое картой Рамачандрана. Отдельные области в этом распределении отвечают той или иной конформации белковоподобной молекулы (рис. 5б). Для молекул аспарагиновой кислоты (Asp) на карте принято выделять четыре наиболее выраженных области, отвечающие следующим вторичным структурам белка: β -складчатости, полипролиновой спирали-II, правозакрученной и левозакрученной α -спиралям. Наиболее вытянутым конформациям молекул Asp соответствуют структуры полипролина-II и β -складчатости (шаг спирали 0.936 нм и 0.65 – 0.7 нм соответственно), которые реализуются в водном растворе при $\text{pH} > 5$. В случае меньшего pH реализуются более сжатые конформации, отвечающие структуре α -спирали (шаг спирали 0.54 нм) [5]. Стоит отметить, что конформация Asp, отвечающая

структуре правозакрученной α -спирали, является энергетически более выгодной в отличие от структуры левозакрученной α -спирали, при формировании которой возникает необходимость пространственно разнести объемные боковые группы (карбоксильные и метиленовые).

а)



б)

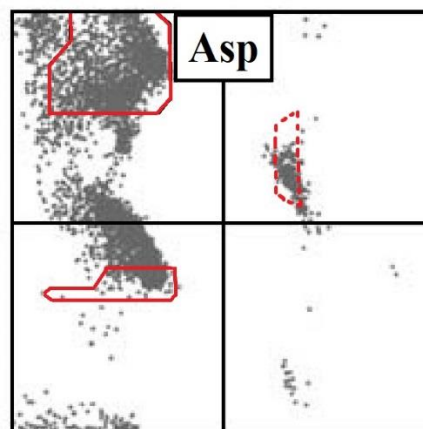


Рисунок 5. а) Наглядное представление двугранных углов ϕ и Ψ для димера белковоподобной молекулы. б) Карта Рамачандрана с принятыми обозначениями разрешенных стабильных (сплошные линии) и разрешенных нестабильных (пунктирные линии) областей для остатков аспарагиновой кислоты. Отмеченные на карте области соответствуют конформациям правозакрученной α -спирали (α), левозакрученной α -спирали (α_L), полипролиновой спирали-II (PII), β -листа (β) [19].

Распределение двугранных углов для молекулы PGA в воде, полученное в результате моделирования методом молекулярной динамики, соответствует конформации полипролиновой спирали-II (рис. 6а) [15]. При добавлении хлорида натрия более выраженной становится область, отвечающая конформации α -спирали (рис. 6б), вследствие адсорбции ионов натрия на молекуле PGA.

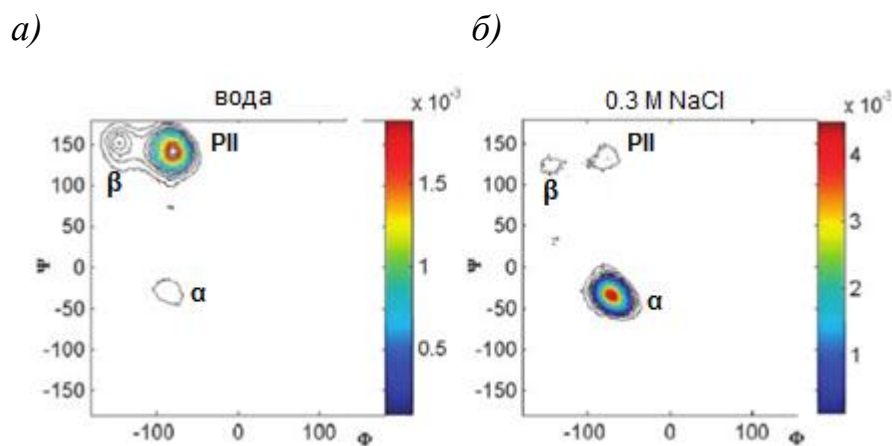


Рисунок 6. Распределение двугранных углов для а) PGA в воде и б) в растворе хлорида натрия [15].

Исследование равновесных состояний PGA в одновалентных солевых растворах [20] показывает, что конформация полимера зависит от выбора силового поля, и особую роль играют параметры, описывающие взаимодействия Ван-дер-Ваальса для ионов. Авторами работы [20] было показано, что в случае моделирования PGA в растворе хлорида натрия конформация цепочки оказывается чувствительна даже к незначительному изменению параметров Ван-дер-Ваальса для ионов натрия. Для раствора KCl такого влияния не наблюдается. Поскольку радиус K^+ существенно больше радиуса Na^+ , то варьирование его величины в тех же пределах (что и для Na^+) не оказывает особого влияния на результаты моделирования, которые хорошо согласуются с экспериментом [17]. Таким образом, при моделировании ионизированных белковоподобных молекул важным является выбор типа противоионов.

Настоящая работа посвящена моделированию PAsp в растворах хлорида кальция. Кальций является двухвалентным ионом и, соответственно, электростатические взаимодействия в системе намного более сильные. Можно полагать, что процессы, происходящие в такой системе, должны быть менее чувствительны к выбору параметров Ван-дер-Ваальса для кальция.

Выбор силового поля

Известно, что корректность полноатомного моделирования зависит от выбора силового поля. Многие силовые поля, используемые для полноатомного моделирования белковых молекул, переоценивают энергетическую выгодность конформации α -спирали, как было описано в работе [21] при сравнении с экспериментальными результатами ЯМР. Тем не менее, авторы одной из работ [22] показали, что характеристики белковоподобной молекулы при моделировании с использованием силовых полей Charmm27 и Amber-ildn соответствуют экспериментальным значениям в пределах погрешности. Кроме того, в работе [23] было проведено не только сравнение данных моделирования с результатами ЯМР, но и попытка воспроизведения правильной вторичной структуры белковоподобных молекул с использованием разных силовых полей. Результаты работы [23] показывают, что самые последние версии силовых полей, хоть и не идеальны, дают корректное описание многих структурных и динамических характеристик белков. Сравнение результатов моделирования в разных силовых полях с экспериментальными данными [21–24] показывает, что семейства силовых полей Charmm и Amber и их последние модификации в целом наиболее корректно описывают конформацию белковоподобных молекул в водных растворах.

Модели и метод

В настоящей работе для описания поведения PAsp в водных растворах минеральных солей было выбрано силовое поле Charmm27. Поскольку в дальнейшем планируется исследование процессов полимериндуцированной минерализации бактериальной целлюлозы, которая показала себя перспективной органической матрицей при синтезе композитных материалов для создания костных имплантатов [25], немаловажным является тот факт, что силовое поле Charmm было успешно использовано для моделирования бактериальной целлюлозы [26].

Система (рис. 7) включала в себя молекулу PAsp, состоящую из 32 мономерных звеньев, соответствующее количество противоионов калия, молекул воды, ионов хлора и кальция в концентрациях, указанных в таблице 2.

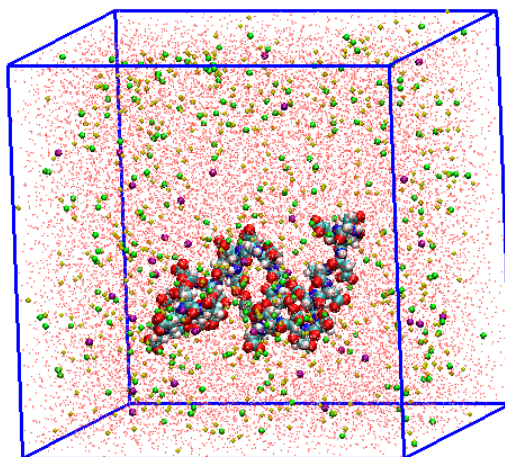


Рисунок 7. Кубическая ячейка моделирования, состоящая из молекулы PAsp, противоионов калия, хлорида кальция и молекул воды (цветами обозначены следующие атомы: зеленым – ионы кальция, желтым – хлора, фиолетовым – калия).

Таблица 2. Количество молекул воды, ионов кальция и хлора, соответствующее различным концентрациям соли.

Концентрация соли, моль/кг	Количество молекул воды	Количество ионов кальция	Количество ионов хлора
0	11 146	0	0
0.03	11 095	6	12
0.07	11 071	14	28
0.29	10 939	58	116
0.75	10 680	145	290
1	10 543	190	380
1.2	10 435	226	452
1.4	10 330	262	524
1.6	10 228	296	592
1.8	10 126	330	660
2	10 027	363	726
3	9 562	519	1 038

Концентрации соли варьировались в широких пределах для того, чтобы изучить условия, при которых происходят конформационные изменения молекулы PAsp, обусловленные взаимодействием с ионами соли.

Размеры ячейки моделирования составляли 7 нм x 7 нм x 7 нм. Моделирование проводилось в NPT ансамбле при температуре 300 К и давлении 1 бар, что соответствует условиям проведения синтеза органоинерального композита методом полимериндуцированной минерализации. Для поддержания постоянных температуры и давления использовались термостат Nose-Hoover и баростат Parrinello-Rahman. Шаг моделирования составлял 0.001 пс. Для описания молекул воды в данном силовом поле используется модель TIP3P, в которой учитываются взаимодействия Ван-дер-Ваальса для водородов.

Суммарное время моделирования составило 3 мкс, на что потребовалось около 130 000 процессор/часов. Моделирование проводилось с использованием программного пакета GROMACS 5.0.5 [27].

Результаты моделирования

В результате моделирования PAsp в водных растворах хлорида кальция были получены такие характеристики, как радиус инерции молекулы, количество ионов кальция в первой координационной сфере карбоксильной группы, суммарный заряд цепочки с адсорбированными на ней ионами, радиальные функции распределения, потенциалы средней силы, времена жизни ионов кальция вблизи карбоксильных групп PAsp и карты Рамачандрана для всех исследованных систем.

Время уравнивания определялось, основываясь на анализе изменения во времени радиуса инерции молекулы PAsp и количества ионов кальция в первой координационной сфере карбоксильной группы. Были вычислены автокорреляционные функции радиуса инерции:

$$ACF_{R_g}(t) = \langle R_g(\xi)R_g(\xi + t) \rangle_{\xi},$$

где R_g – радиус инерции, ξ – время.

На рис. 8, 9 представлены графики автокорреляционных функций радиуса инерции и количества ионов кальция в первой координационной сфере карбоксильной группы PAsp. Временем уравнивания системы считается то время, за которое автокорреляционная функция спадает в e раз. Из графика (рис. 8а) видно, что значение автокорреляционной функции радиуса инерции молекулы PAsp в воде спадает в e раз за 3 нс. Для систем с солью автокорреляционная функция спадает на порядок медленнее и изменяется в e раз за 60 нс (рис. 8б). Кроме того, среднее количество ионов кальция в первой координационной сфере карбоксильной группы практически не меняется после 60 нс моделирования (рис. 9). Получаемые характеристики усреднялись по времени моделирования на интервале от 60 нс до 200 нс.

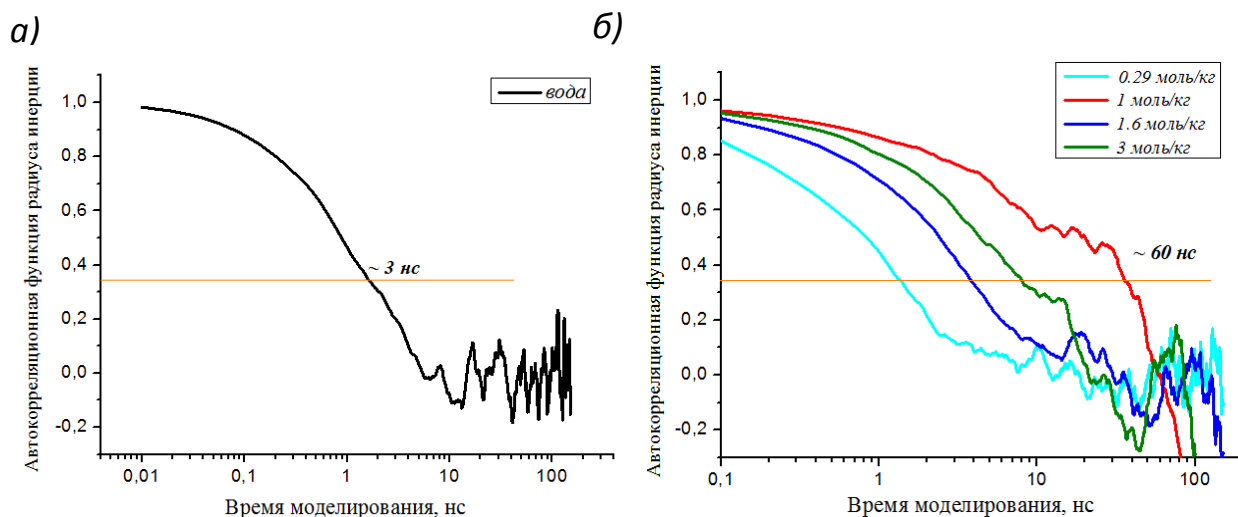


Рисунок 8. Графики автокорреляционных функций для систем а) без соли и б) с солью.

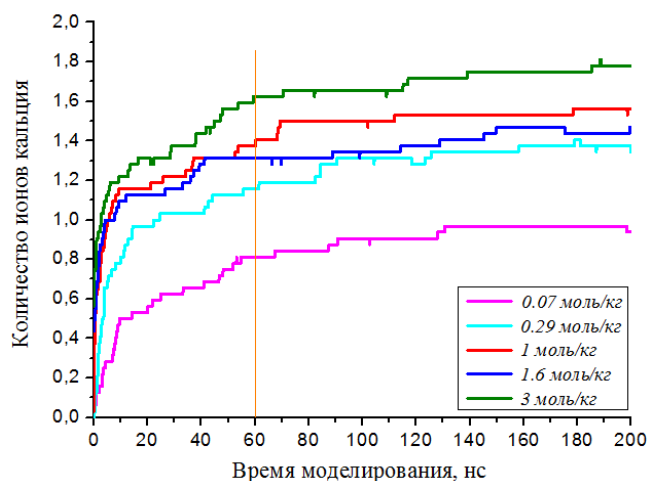


Рисунок 9. График зависимости количества ионов кальция в первой координационной сфере карбоксильной группы в зависимости от времени моделирования при разных концентрациях соли.

Размеры цепочки PAsp в растворах хлорида кальция

О характере изменения размеров цепи PAsp при добавлении соли в раствор можно судить по зависимости радиуса инерции (R_g) от концентрации хлорида кальция (рис. 10а). Падение значения R_g в области низких концентраций соли связано с уменьшением размеров PAsp в результате частичной компенсации заряда ионами кальция и ослабления электростатического отталкивания между мономерами. При концентрации соли 0.07 моль/кг заряд на цепочке (рис. 10б)

близок к нулю и R_g достигает наименьшей величины. При дальнейшем увеличении концентрации соли размеры цепи снова увеличиваются, что обусловлено инверсией заряда и электростатическим отталкиванием мономеров PAsp. Как видно из рис. 10б, уже при концентрации соли, равной 0.29 моль/кг, суммарный заряд цепочки с адсорбированными на ней ионами достигает положительного значения, т. е. возникает инверсия заряда. Такое поведение радиуса инерции при повышении концентрации соли в растворе (рис. 3) согласуется с результатами крупнозернистого моделирования полиэлектролитов [13] и полноатомного моделирования полиметакриловой кислоты [28].

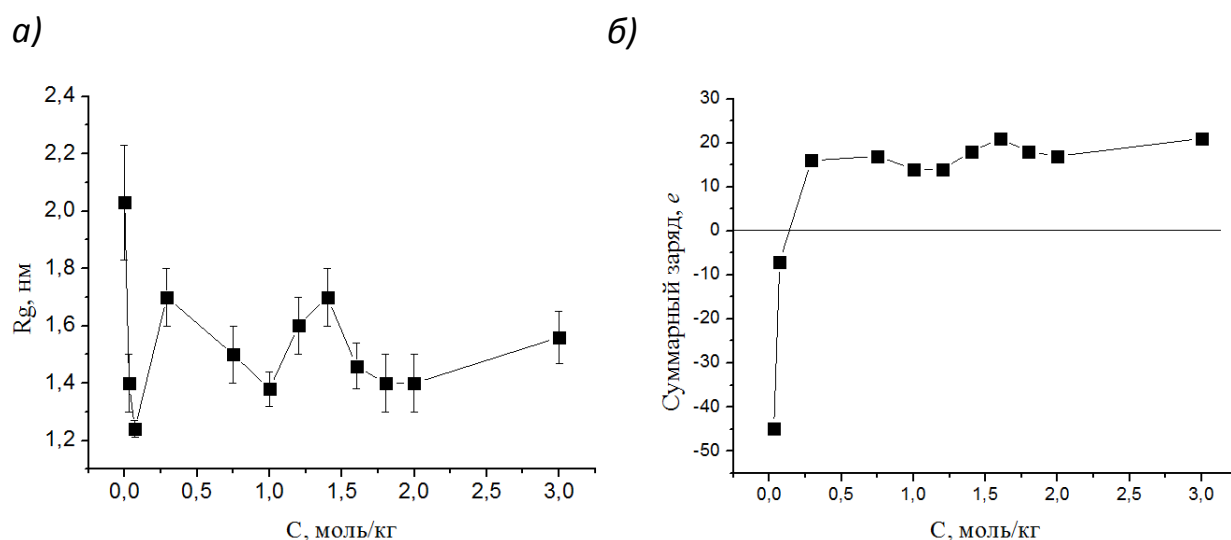


Рисунок 10. Графики зависимостей а) радиуса инерции R_g и б) суммарного заряда цепочки с адсорбированными на ней ионами от концентрации соли C в растворе.

Для анализа изменения формы молекулы с ростом концентрации была получена зависимость тензора инерции молекулы PAsp от концентрации хлорида кальция (рис. 11). Видно, что молекула представляет собой не симметричный клубок, а эллипсоид, изменения длинной оси которого коррелируют с изменением R_g с ростом концентрации (рис. 10а).

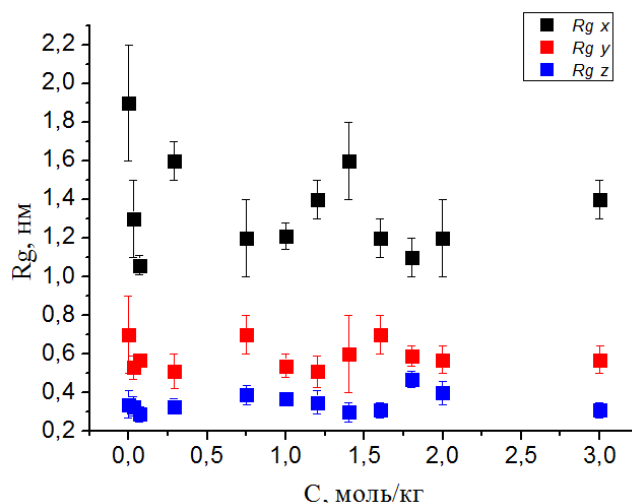


Рис. 11. Зависимость тензора инерции от концентрации соли в системах.

Распределение ионов кальция вблизи карбоксильных групп PAsp

Изменения радиуса инерции с ростом концентрации соли обусловлены адсорбцией ионов кальция на цепочке PAsp. Для того, чтобы исследовать распределение кальция вблизи карбоксильных групп PAsp, была рассчитана функция радиального распределения ионов кальция относительно углеродов карбоксильных групп. Функция радиального распределения $g_{AB}(r)$ определяет вероятность нахождения атома кальция на определенном расстоянии от карбоксильной группы PAsp:

$$4\pi r^2 g_{AB}(r) = V \sum_{i \in A}^{N_A} \sum_{j \in B}^{N_B} P(r),$$

где V – объем, $P(r)$ – вероятность нахождения атома B на расстоянии r от атома A .

Как видно из рис.12, существует два наиболее вероятных положения ионов кальция около карбоксильной группы PAsp. Первый пик отвечает положению иона кальция между двумя кислородами карбоксильной группы (рис. 13а). Второй пик отвечает положению ионов кальция вблизи одного из атомов кислорода (рис. 13б).

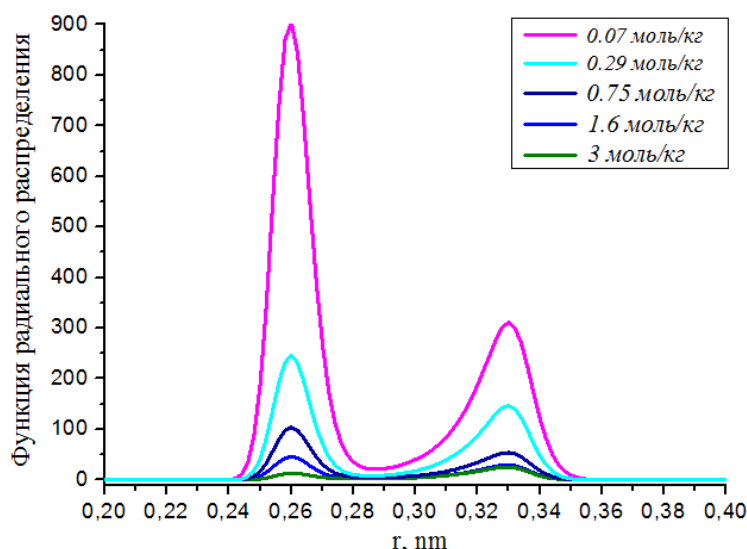


Рисунок 12. Функция радиального распределения ионов кальция относительно углеродов карбоксильных групп молекулы PAsp.

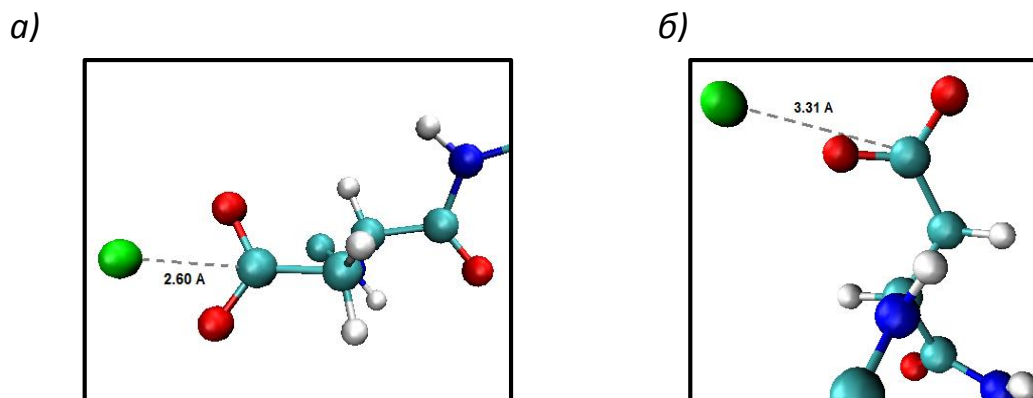


Рисунок 13. Мгновенные снимки, иллюстрирующие наиболее вероятные положения ионов кальция а) между двумя кислородами карбоксильной группы и б) вблизи одного из атомов кислорода карбоксильной группы молекулы PAsp (зеленым цветом обозначены ионы кальция, красным – атомы кислорода, голубым – атомы углерода, синим – атомы азота и серым – атомы водорода).

На основе полученных функций радиального распределения $g_{AB}(r)$ были рассчитаны потенциалы средней силы PMF:

$$PMF = -kT \ln g_{AB}(r).$$

На рис. 14 приведены потенциалы средней силы для взаимодействий ионов кальция с карбоксильными группами PAsp и ионов кальция с молекулами воды. Большая глубина минимума в случае взаимодействия ионов кальция с PAsp

говорит о том, что ионам кальция выгодно находиться в контакте с карбоксильными группами PAsp, а не в объеме. Высота энергетического барьера для перехода из адсорбированного состояния в объем превышает значение тепловой энергии (равное 2.5 кДж/моль при температуре $T = 300$ К) более, чем в 10 раз.

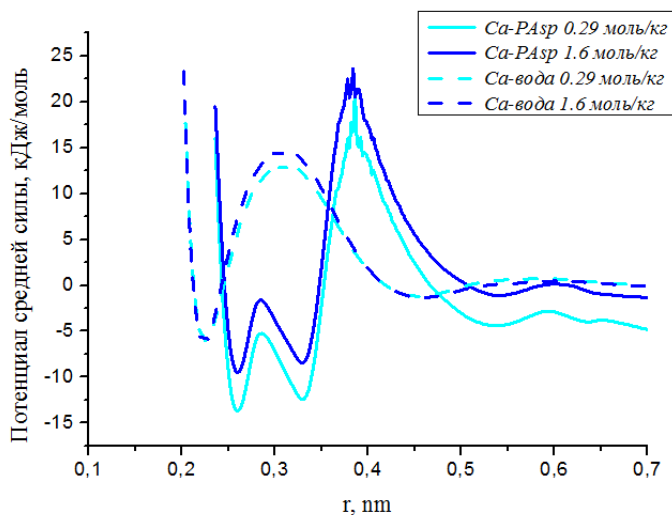


Рисунок 14. Потенциал средней силы для взаимодействий ионов кальция с карбоксильными группами PAsp (сплошные линии) и с молекулами воды (пунктирные линии) для двух концентраций хлорида кальция, равных 0.29 моль/кг и 1.6 моль/кг.

Высота энергетического барьера связана с временем жизни контакта. При известных величинах энергетических барьеров отношение времен жизни контактов определяется следующим образом:

$$\frac{t_2}{t_1} = \frac{\exp(\Delta E_2/kT)}{\exp(\Delta E_1/kT)},$$

где t_2 и t_1 – времена жизни ионов кальция вблизи карбоксильных групп PAsp и молекул воды, ΔE_1 и ΔE_2 – значения энергетических барьеров для взаимодействий ионов кальция с карбоксильными группами PAsp и ионов кальция с молекулами воды соответственно.

Оценка времен жизни ионов кальция у карбоксильных групп PAsp (с учетом времени жизни контакта иона кальция с молекулой воды, равным 3 нс

[29]) показала, что значения времен жизни сопоставимы со временем моделирования для всех рассмотренных концентраций соли в растворе и составляют ~ 200 – 300 нс.

Ионы кальция, взаимодействуя с карбоксильными группами PAsp, могут образовывать кальциевые мостики (рис.15), и тем самым препятствовать конформационным изменениям.

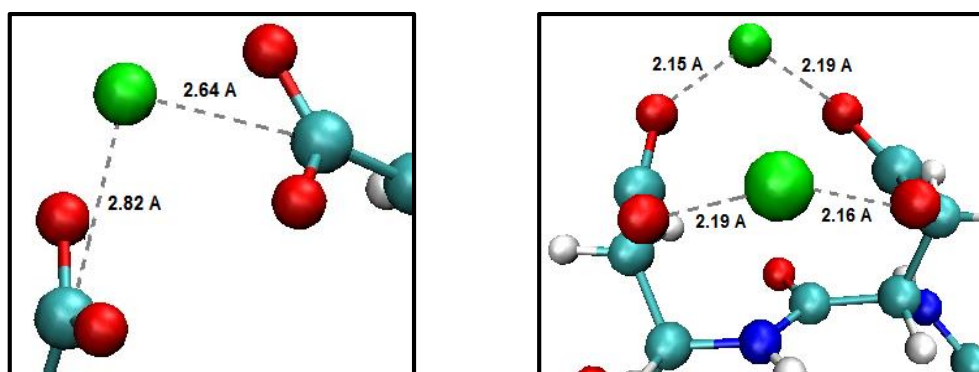


Рисунок 15. Мгновенные снимки, иллюстрирующие наличие кальциевых мостиков между карбоксильными группами.

Возможны следующие варианты адсорбции ионов кальция на карбоксильных группах: адсорбция иона кальция на отдельную карбоксильную группу (рис.16а), адсорбция двух ионов кальция на отдельную карбоксильную группу (рис.16б), формирование кальциевого мостика с одним ионом кальция (один ион кальция делят две карбоксильные группы) (рис.16в), формирование кальциевого мостика с двумя ионами кальция (два иона кальция делят две карбоксильные группы) (рис.16г).

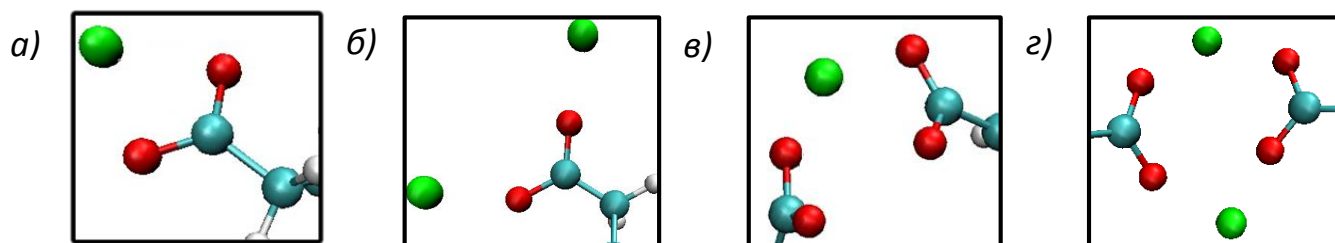


Рисунок 16. Мгновенные снимки, иллюстрирующие возможные случаи адсорбции ионов кальция на карбоксильные группы PAsp.

На рисунке 17 представлено количество реализованных вышеперечисленных возможных вариантов адсорбции ионов кальция на карбоксильных группах в зависимости от концентрации хлорида кальция. При концентрации 0.07 моль/кг количество кальциевых мостиков, образованных одним ионом кальция максимально, что и приводит к уменьшению размера цепочки (рис. 10а). При последующем повышении концентрации до 0.29 моль/кг растет число ионов кальция, адсорбированных на отдельную карбоксильную группу, а количество мостиков уменьшается, что отражается и на значениях радиуса инерции при этих концентрациях. С ростом концентрации растет количество случаев, когда на одну отдельную карбоксильную группу приходится уже два иона кальция, а мостики включают в себя уже два иона кальция вместо одного (рис. 15б). Следует отметить, что в области концентраций выше 0.29 моль/кг наблюдаемые (рис. 10а) флуктуации величины радиуса инерции обусловлены локальными конформационными перестройками, которые зависят от того, куда встраиваются новые адсорбируемые ионы кальция.

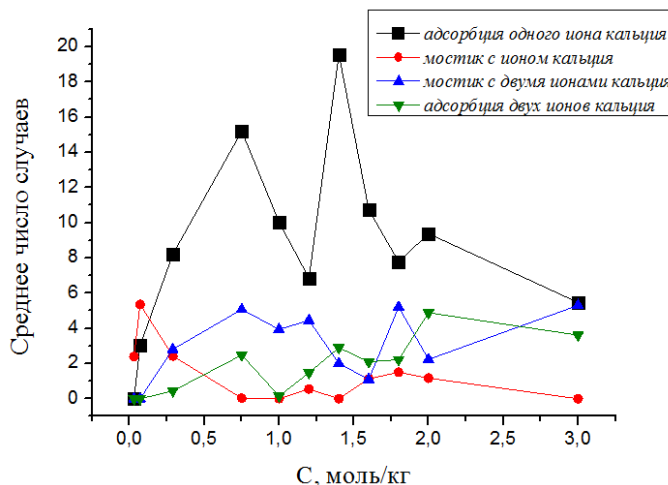


Рисунок 17. Количество одиночных адсорбированных ионов кальция (черные точки) и двух ионов кальция на одну карбоксильную группу PAsp (зеленые точки), кальциевых мостиков с одним (красные точки) и двумя ионами кальция (синие точки) между карбоксильными группами PAsp в зависимости от концентрации соли.

Конформация цепочки PAsp

На рисунке 18 представлена карта Рамачандрана, полученная в результате моделирования PAsp в воде. Положения максимумов на данной карте соответствуют положениям максимумов на карте, полученной при анализе рентгеноструктурных данных 4300 упорядоченных остатков аспарагиновой кислоты (рис. 5б) [19].

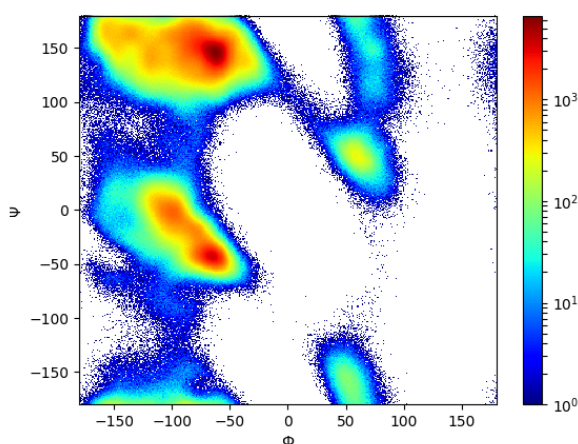


Рис. 18. Карта Рамачандрана для PAsp в воде.

На карте, полученной в результате моделирования PAsp в воде (рис. 18) можно выделить 3 основных области: области, отвечающие структурам полипролина-II, β -складчатости и α -спирали (рис. 20). Наличие областей, отвечающих более вытянутым конформациям (полипролин-II и β -складчатость), обусловлено электростатическим отталкиванием мономеров полиэлектролита в воде. Наличие области, отвечающей структуре α -спирали, связано с тем, что используемое силовое поле Charmm27 (как и в случае большинства используемых силовых полей [21]) переоценивает энергетическую выгодность конформации, соответствующей структуре α -спирали.

Разные по длине участки молекулы могут одновременно находиться в разных конформационных состояниях. Например, на рисунке 19 проиллюстрированы возможные 4 типа конформационных состояний для отдельного участка цепи PAsp.

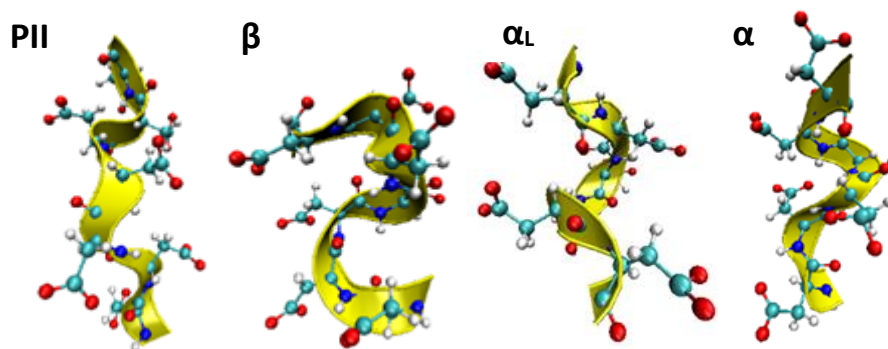


Рис. 19. Мгновенные снимки, иллюстрирующие реализацию различных конформаций молекулы PAsp.

В результате интегрирования выраженных областей на картах Рамачандрана, полученных при разных концентрациях, была получена зависимость доли углов внутреннего вращения, соответствующих различным конформациям мономеров цепи, от концентрации соли (рис. 20а). Видно, что при добавлении соли доля углов внутреннего вращения, соответствующих “сжатым” конформациям, растет и достигает максимального значения при концентрации 0.29 моль/кг, при которой наблюдается инверсия заряда. Основной вклад в это изменение вносит появление новой выраженной области, отвечающей структуре левозакрученной α -спирали (рис. 20б).

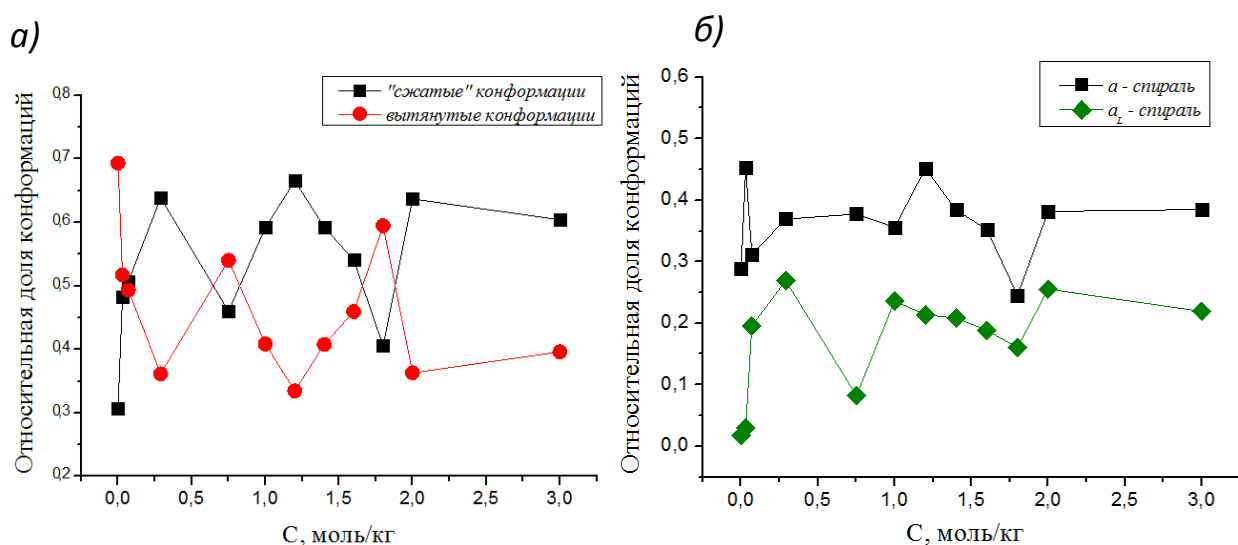


Рисунок 20. Зависимость доли углов, отвечающих а) вытянутым и «сжатым» конформациям PAsp и б) правозакрученной и левозакрученной α -спиралям.

Появление левозакрученной α -спирали обусловлено формированием кальциевых мостиков, которые стабилизируют данную конформацию, несмотря на незначительный проигрыш в энергии за счет пространственных ограничений, связанных с объемными взаимодействиями между кислородами амидных и метиленовых групп. Важно отметить, что прямой корреляции между изменением распределения углов и радиуса инерции с ростом концентрации соли не наблюдается. Это связано в первую очередь с тем, что были определены только доли углов внутреннего вращения, а не длины регулярных участков и их соотношения. Для того, чтобы показать связь между конформационными изменениями основной цепи PAsp и изменением радиуса инерции необходимо провести такой дополнительный анализ.

Заключение

С использованием компьютерного моделирования методом полноатомной молекулярной динамики было проведено исследование влияния двухвалентной соли хлорида кальция на конформацию молекулы поли- α -L-аспарагиновой кислоты.

Показано, что при увеличении концентрации соли радиус инерции молекулы PAsp при низких концентрациях уменьшается, а при достижении инверсии заряда на цепочке увеличивается. Данные результаты хорошо согласуются с исследованиями полиэлектролитов в растворах многовалентных солей других авторов [14, 29].

Установлено, что при повышении концентрации соли изменяется распределение углов внутреннего вращения основной цепи. Увеличивается доля углов, отвечающих структуре левозакрученной α -спирали, которая практически отсутствует для системы с PAsp в воде.

Изменения конформации связаны с адсорбцией ионов кальция на молекулу PAsp и, в первую очередь, с образованием кальциевых мостиков между боковыми карбоксильными группами молекулы.

Показано, что время жизни контакта иона кальция с карбоксильной группой сопоставимо с временем моделирования. Для получения более корректных результатов необходимо либо проведение более длительного моделирования, либо дополнительная серия моделирований с различными стартовыми конфигурациями PAsp.

Список литературы

1. Kolodinska D., Hubicki Z., Geca M. Polyaspartic acid as a new complexing agent in removal of heavy metal ions on polystyrene anion exchangers // *Chem. Eng. J.* 2008. Vol. 47, № 16. P. 6221–6227.
2. Piatkowski M., Radwan-Pragłowska J., Raclavsky K. Application of poly(aspartic acid) and its derivatives in medicine and pharmacy // *Asian J. Appl. Sci.* 2015. Vol. 3, № 5. P. 718–723.
3. Cui R., Gu N., Li C. Polyaspartic acid as a green corrosion inhibitor for carbon steel // *Mater. Corros.* 2011. Vol. 62, № 4. P. 362–369.
4. Gower L.B. Biomimetic model systems for investigating the amorphous precursor pathway and its role in biomineralization // *Chem. Rev.* 2008. Vol. 108, № 11. P. 1–11.
5. Saudek V., Schmidt P. Conformational study of poly(α -L-aspartic acid) // *Biopolymers.* 1982. Vol. 21. P. 1011–1020.
6. Thula T.T. et al. Mimicking the nanostructure of bone: comparison of polymeric process-directing agents // *Polymers (Basel).* 2011. Vol. 3, № 1. P. 10–35.
7. Kundagrami A., Muthukumar M. Theory of competitive counterion adsorption on flexible polyelectrolytes: Divalent salts // *J. Chem. Phys.* 2008. Vol. 128, № 24. P. 1–16.
8. Dobrynin A. V., Rubinstein M. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces // *Prog. Polym. Sci.* 2005. Vol. 30, № 11. P. 1049–1118.
9. Jee S.S., Thula T.T., Gower L.B. Development of bone-like composites via the polymer-induced liquid-precursor (PILP) process. Part 1: Influence of polymer molecular weight // *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.*, 2010. Vol. 6, № 9. P. 3676–3686.
10. Schenk A.S. et al. Polymer-induced liquid precursor (PILP) phases of calcium carbonate formed in the presence of synthetic acidic polypeptides - relevance to biomineralization // *Faraday Discuss.* 2012. Vol. 159, № 1. P. 327–344.

11. Antebi B. et al. Biomimetic collagen-hydroxyapatite composite fabricated via a novel perfusion-flow mineralization technique. // *Tissue Eng. Part C*. 2013. Vol. 19, № 7. P. 487–496.
12. Thula-Mata T. et al. Remineralization of artificial dentin lesions via the polymer- induced liquid-precursor (PILP) process // *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 2011. Vol. 100, № 2. P. 130–134.
13. Wei Y.F., Hsiao P.Y. Effect of chain stiffness on ion distributions around a polyelectrolyte in multivalent salt solutions // *J. Chem. Phys.* 2010. Vol. 132, № 2. P. 1–28.
14. Ramachandran S. et al. Dynamics of dilute solutions of poly(aspartic acid) and its sodium salt elucidated from atomistic molecular dynamics simulations with explicit water // *J. Phys. Chem. B*. 2013. Vol. 117, № 44. P. 13906–13913.
15. Fedorov M. V, Goodman J.M., Schumm S. The effect of sodium chloride on poly-L-glutamate conformation. // *Chem. Commun.* 2008. Vol. 7345, № 8. P. 896–898.
16. Fedorov M. V, Goodman J.M., Schumm S. To switch or not to switch : the effects of potassium and sodium ions on α -poly-L-glutamate conformations in aqueous solutions // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. Vol. 131, № 31. P. 10854–10856.
17. Xiong K., Ma L., Asher S.A. Conformation of poly-L-glutamate is independent of ionic strength // *Biophys. Chem.* 2012. Vol. 162, № 1. P. 1–5.
18. Ramakrishnan C., Ramachandran G.N. Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations // *Proc. Indian Acad. Sci. Sect. A*. 1964. Vol. 59, № 5. P. 327–343.
19. Hollingsworth S.A., Karplus P.A. A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins // *Biomol. Concepts*. 2010. Vol. 1, № 3–4. P. 271–283.
20. Marchand G. et al. Effect of the cation model on the equilibrium structure of poly-L-glutamate in aqueous sodium chloride solution // *J. Chem. Phys.* 2015. Vol. 143, № 22. P. 1–11.
21. Best R.B., Buchete N., Hummer G. Are current molecular dynamics force fields

- too helical ? // *Biophys. J.* 2008. Vol. 95, № 9. P. 4494–4494.
22. Beauchamp K.A. et al. Are protein force fields getting better ? A systematic Benchmark on 524 diverse NMR measurements // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. Vol. 8, № 4. P. 1409–1414.
 23. Lindorff-Larsen K. et al. Systematic validation of protein force fields against experimental data // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 2. P. 1–6.
 24. Pitera M.R.S.W., Pande W.C.S.S., Shirts M.R. Extremely precise free energy calculations of amino acid side chain analogs : Comparison of common molecular mechanics force fields for proteins Extremely precise free energy calculations of amino acid side chain analogs : Comparison of common molecular m // *J. Chem. Phys.* 2003. Vol. 119, № 11. P. 5740–5761.
 25. Wan Y.Z. et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-bacterial cellulose nanocomposites // *Compos. Sci. Technol.* 2006. Vol. 66, № 11–12. P. 1825–1832.
 26. Lukasheva N. V, Tolmachev D.A. Cellulose nanofibrils and mechanism of their mineralization in biomimetic synthesis of hydroxyapatite/native bacterial cellulose nanocomposites. Molecular dynamic simulations // *Langmuir.* 2015. Vol. 32, № 1. P. 125–134.
 27. Abraham M.J. et al. Gromacs: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX.* 2015. Vol. 1, № 2. P. 19–25.
 28. Chung Y.T., Huang C.I. Ion condensation behavior and dynamics of water molecules surrounding the sodium poly(methacrylic acid) chain in water: A molecular dynamics study // *J. Chem. Phys.* 2012. Vol. 136, № 12.
 29. Marcus Y. Ion Solvation // *Angew. Chemie.* 1987. Vol. 99, № 8. P. 821–826.