

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

МАЛЫШКО ЕКАТЕРИНА ВЛАДИМИРОВНА

**ХИРАЛЬНЫЙ ДУАЛИЗМ
КАК ФИЗИЧЕСКАЯ ОСНОВА СТРАТИФИКАЦИИ
В СТРУКТУРНЫХ ИЕРАРХИЯХ БЕЛКОВ**

Специальность 03.01.02 – «Биофизика»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва - 2018

Работа выполнена на кафедре биофизики физического факультета
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель:

Твердислов Всеволод Александрович,
доктор физико-математических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Нечипуренко Юрий Дмитриевич,
доктор физико-математических наук, старший
научный сотрудник ФГБУН «Институт молекулярной
биологии имени В.А. Энгельгардта Российской
академии наук»

Чеботарева Наталья Александровна,
доктор биологических наук, ведущий научный
сотрудник лаборатории структурной биохимии белка
ФГУ «Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»

Яминский Игорь Владимирович,
доктор физико-математических наук, профессор
кафедры физики полимеров и кристаллов
физического факультета МГУ имени
М.В.Ломоносова

Защита диссертации состоится 15 ноября 2018 года в 15.30 часов на
заседании диссертационного совета МГУ.01.04 Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы,
д. 1, стр. 2, Физический факультет МГУ, ЦФА.

E-mail: info@physics.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной
библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте ИАС «ИСТИНА»:

https://istina.msu.ru/dissertation_councils/councils/28357490/

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.01.04,
кандидат технических наук

Сидорова А.Э.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности.

Одной из основных и в значительной степени не решенных физических проблем молекулярной биофизики является проблема детерминированного структурообразования в субмолекулярных и надмолекулярных структурах. Замечательные достижения биохимии и молекулярной биологии, успешное использование разнообразных физических методов в изучении биомолекулярных структур, математическое моделирование структур и взаимодействий в таких системах позволили достаточно подробно описать строение и функции биомолекул. Качественным образом описаны типы структур, получены их физические характеристики, соответственно, для каждого уровня организации. Развита теоретические модели и точные количественные методы описания непосредственного взаимодействия атомов и химических групп в макромолекулах, в частности, методы молекулярной динамики. Вместе с тем, принципиальный вопрос относительно существования единого физического фактора, лежащего в основе дискретного иерархического структурообразования в белках и нуклеиновых кислотах, остаётся открытым. Решение этой проблемы напрямую связано с выяснением физических механизмов фолдинга макромолекул, докинга, работы макромолекул как молекулярных машин, преобразующих вещество, энергию и информацию в живых системах. В данный момент требуется уже не столько совершенствование методов исследования данной проблемы, сколько выработка новых общих подходов. Нам представляется, что наряду с традиционно разрабатываемыми в биофизике макромолекул научными направлениями актуальным и перспективным может оказаться общий подход, сквозным образом рассматривающий симметричные характеристики структурных иерархий в макромолекулах [1].

Важнейшие физические признаки живых систем, а также принципы их организации и функционирования напрямую или косвенным образом связаны с понятиями симметрии и нарушения симметрии. Так, в физике явления симметрии бывают как проявлениями свойств материи (например, в кристаллах), так и лежат в основе организации самой материи (законы сохранения, теория суперструн). Так и в биологии: симметрии не только объединяют в единое целое структуры и функции живого (морфогенез, эмбриогенез, филлотаксис), но, что представляется нам

принципиально важным, лежат в основе иерархического структурообразования биомолекулярных систем и их функционирования как молекулярных машин [1].

Ранее В.А.Твердисловым был предложен и в настоящей работе обосновывается новый подход к решению этой проблемы, основанный на представлениях о сопряженной знакопеременной хиральности структурных уровней субмолекулярных и надмолекулярных структур [1]. Гомохиральность первичных структур белков, составленных неразветвленными цепочками левых аминокислот служит, как мы считаем, первопричиной стратификации структурных уровней макромолекулярных структур в неживой и живой природе.

В работе описана системная молекулярно-биологическая закономерность: начиная с уровня асимметричного углерода в аминокислотах первичной структуры белков (и в дезоксирибозе в ДНК), прослежена тенденция чередования знака хиральности внутримолекулярных структурных уровней L-D-L-D для белков (и D-L-D-L для ДНК). Частным случаем хиральности выступает спиральность. С этих позиций молекулярная биология приобретает принципиально новый аспект - предстаёт как периодическая система хиральных элементов. Подход позволяет создать единую сквозную классификацию структурных уровней белков и нуклеиновых кислот, позволяющую с общих позиций продолжить развитие физической концепции биомолекулярных машин, а также рассмотреть пути разрешения парадокса Левинталя в проблеме фолдинга белков [1-3].

Цель исследования - разработать концепцию иерархического структурообразования в белках как процесса самоорганизации иерархий знакопеременных хиральных структур с изменяющейся размерностью, масштабами, симметриями и функциями.

В работе были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести качественный и количественный анализ спиральных и суперспиральных структур в белках по материалам баз данных PDB, CC+;
2. Выполнить термодинамический анализ формирования гомохиральной первичной структуры белков из смеси энантиомеров аминокислот;
3. Выполнить термодинамический анализ формирования иерархий знакопеременных хиральных структур белков с изменяющимися масштабами, симметриями и функциями;

4. Рассмотреть концепцию фолдинга как гипотезу о самосборке деталей общей макромолекулярной конструкции, обладающих симметричной спецификой и формирующихся в процессах автоволновой самоорганизации;
5. Провести качественный анализ хирально знакопеременного иерархического структурообразования в нуклеиновых кислотах;
6. Проанализировать концепцию «белок – машина» с позиций хирально обусловленной стратификации в иерархиях белковых структур, формирующих «выделенные механические степени свободы»;
7. Выполнить анализ гипотезы относительно хиральной основы системного представления молекулярной биологии как периодической системы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Спонтанное формирование знакопеременных иерархий хиральных структур как физическая закономерность.
2. Обоснованность концепции структурной иерархичности белков и нуклеиновых кислот, основанной на формировании знакопеременных хиральных иерархий.
3. Гомохиральность первичных структур белков как источник свободной энергии для процессов фолдинга и формирования вторичных, третичных и четвертичных структур белков как молекулярных машин.

Научная новизна исследования

Впервые по материалам баз данных PDB [4] и CC+ [5] проведен системный анализ хиральных структур на внутри- и надмолекулярных уровнях структурных иерархий белков и ДНК, а также ряда их комплексов. Явление хирального дуализма рассмотрено как уникальный физический инструмент молекулярной биологии, связанный с явлением нарушения симметрии и позволяющий формировать иерархические конструкции белков и нуклеиновых кислот со стратифицированными уровнями внутри- и надмолекулярной организации. Схожесть иерархического структурообразования в гомохиральных системах неживой и живой природы указывает на эволюционную траекторию формирования структурных иерархий в биомacroмолекулах. Ресурс свободной энергии, расходуемый в процессе фолдинга белков, заключен в гомохиральности мономеров, составляющих первичные структуры макромолекул (L-аминокислоты, D-рибоза, D-дезоксирибоза). Чередование знаков хиральности вложенных структурных уровней – инструментальный «приём»

фолдинга. Симметрические особенности иерархических молекулярных конструкций, обусловленные гомохиральностью первичных структур, позволяют им функционировать как молекулярным машинам, обладающим выделенными степенями свободы. Молекулярные машины конструктивно и функционально являются хиральными объектами. Симметричная инфраструктура молекулярной биологии может быть представлена как периодическая система знакопеременных хиральных молекулярных конструкций.

Научная и практическая значимость

Научная значимость исследования связана с обоснованием новой гипотезы относительно иерархического структурообразования в биомакромолекулярных системах, основанной на явлении хиральности. Практическая значимость может быть напрямую связана с изучением механизмов взаимодействия хиральных лекарственных препаратов с клеточными структурами, с созданием новых материалов и искусственных молекулярных конструкций, исполняющих функции молекулярных машин, преобразующих энергию, вещество, информацию.

Личный вклад автора

Автор диссертации принимал непосредственное участие в обосновании и разработке всех основных этапов формирования концепции, основной смысл которой состоит в выработке единого физического критерия для описания структурных иерархий биологических макромолекул на основе представлений о хиральном дуализме. Автором проведен качественный и количественный анализ спиральных и суперспиральных структур в белках и нуклеиновых кислотах по материалам баз данных PDB и CC+, выполнен термодинамический анализ формирования гомохиральной первичной структуры белков из смеси энантиомеров аминокислот и термодинамический анализ формирования иерархий знакопеременных хиральных структур белков. Автором также выполнен подбор и анализ химических и физико-химических систем абиогенного происхождения, гомохиральных в своей основе и способных формировать хирально знакопеременные иерархически организованные структуры.

Апробация работы. Результаты работы представлены на 13 международных и всероссийских конференциях (14 публикаций в сборниках тезисов).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 8 статей, из них 4 в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах Web of Science, Scopus, RSCI.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, содержащих обзор литературных данных, изложение и обсуждение полученных автором результатов, заключения, результатов и выводов, списка цитируемой литературы и списка публикаций автора. Работа изложена на 146 страницах, включает 3 таблицы и 40 рисунков. Список литературы включает 142 наименования.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение содержит общую характеристику темы работы, обоснование актуальности, определение цели и задач диссертационного исследования, изложение общих положений исследования, научной новизны, научной и практической значимости.

В первой главе обсуждается значимость и возможности сквозного описания процессов структурообразования в субмолекулярных и надмолекулярных структурах клеток с позиций их симметричности. Обосновывается возможность рассмотрения хирального дуализма в аминокислотах и углеводах в качестве универсального физического фактора в процессах формирования иерархических структур (первичных, вторичных и т.д.). Обсуждается соответствие ионной клеточной и молекулярной хиральной асимметрий в живых системах как фундаментального принципа возникновения и организации живой материи. Рассматриваются физические основания соответствия номенклатурных критериев хиральности при разных типах симметрии структур.

Симметрические (хиральные) характеристики упорядоченности структуры системы на одном её уровне определяют её масштаб и симметрические (хиральные) характеристики на следующем иерархическом уровне. Ранее были сформулированы два общих правила, касающиеся структурообразования в гомохиральных системах [1]:

- Гомохиральная система, обладающая запасом свободной энергии, способна эволюционировать в пределах одного иерархического уровня, сохраняя тип симметрии и знак преобладающей хиральности («правой» — D или «левой» — L).

- Гомохиральная эволюционирующая система при прохождении точек бифуркации имеет тенденцию к спонтанному формированию последовательности

новых иерархических уровней с чередующимся знаком хиральности заново образующихся структур.

Возникновение знакопеременной хиральной иерархичности связано с исходным запасанием в таких системах свободной энергии (в силу хиральной диссимметрии) и её диссипацией в ходе спонтанного образования иерархий знакопеременных L-D-структур-энантиоморфов с изменяющимся типом симметрии. Появляется возможность возникновения дискретной стратифицированной вертикали структур, обладающей свойствами конструкции с выделенными степенями свободы – конструкции, способной осуществлять функции молекулярной машины.

Вторая глава посвящена описанию подбора и анализа химических и физико-химических систем абиогенного происхождения, демонстрирующих общность тенденций формирования иерархических хиральных структур. Рассмотрены примеры структур с переключениями знака хиральности, характеризующихся увеличением масштаба, сменой типа симметрии и размерности.

Механика. Скрученный шнур. Известным и наиболее простым для демонстрации предложенной концепции примером из области механики является скручивание упругих нитей. При закручивании длинного жгута в каком-либо направлении образуются обратные витки спирали. При увеличении напряжения отмечается появление витков того же направления и большей амплитуды – витков «второй моды». При дальнейшем увеличении напряжения после появления второй моды отмечено образование выступов-шпилек и далее при складывании - двойной суперспирали. При этом спираль одного знака хиральности образует шпильки и суперспирали противоположного знака хиральности - понижается уровень свободной энергии.

Полимерные системы. Рассмотрим физико-химические системы, демонстрирующие формирование знакопеременных хиральных уровней. В рассмотренных нами случаях мы говорим о L/D-энантиомерах молекул с одним асимметричным атомом углерода, имеющим четыре разных заместителя. В случаях, когда мы будем говорить о энантиоморфах, мы будем подразумевать «правые» или «левые» спирали, или суперспирали. Соответственно, их ход идет от нас по часовой стрелке или против. Рисунки и литературные источники приведены в диссертации.

В работе Оды и др. (1999г.) продемонстрирована самосборка скрученных лент из некоторого широко распространенного ахирального катионного поверхностно

активного вещества (ПАВа) с L- или D-тарtratом в качестве хирального противоиона в воде и в ряде органических растворителей. Ленты из ахирального катионного ПАВа и L-тарtrата оказались правозакрученными, а ленты из ахирального катионного ПАВа и D-тарtrата – левозакрученными. Ленты, образованные рацемической смесью, оставались незакрученными.

Симметрически замещенные ахиральные и хиральные производные гекса-пери-гексабензокоронена образуют столбчатые мезофазы. Джин и др. (2005г.) синтезировали серию новых амфифильных производных гекса-пери-гексабензокоронена, которые образуют спиральные нанотрубки. «Левые» энантиомеры собираются в правозакрученную спираль, а «правые» - в левозакрученную.

В работе Данилы и соавторов (2011г.) показано, что синтетические неамфифильные производные трис(3(3'-карбамоиламино)-2,2'бипиридил)-бензол-1,3,5-трикарбонамида, содержащие три хиральных бис[(R) или (S)-2-метилбутилтио]-тетратиафульвалена на периферии, могут собираться в закрученные волокна. Это соединение в достаточно большой концентрации может быть растворено в диоксане путем нагревания, но при охлаждении до комнатной температуры образуется осадок. Его анализ с помощью оптической или сканирующей электронной микроскопии позволяет обнаружить формирование волокон, причем из левых энантиомеров собирается правая спираль, а из правых энантиомеров – левая.

В работе Яшимы и соавторов (2009г.) продемонстрировано формирование спиральных структур полиацетилена при присоединении хиральных аминов. При добавлении «левых» (L/S) энантиомеров отмечено образование правозакрученной спирали, а при добавлении «правых» (D/R) энантиомеров – левозакрученной.

Вышеупомянутые примеры демонстрируют смену знака хиральности при переходе с первичного уровня на вторичный – образование правых или левых спиралей из энантиомеров с противоположным знаком хиральности. Рассмотрим примеры систем, демонстрирующих смену знака хиральности при переходе от вторичного к третичному уровню – образование суперспиралей из спиралей.

Схожая с ранее упомянутой системой столбчатых мезофаз из симметрически замещенных ахиральных и хиральных производных гекса-пери-гексабензокоронена (Джин и др., 2005) система с образованием мезофазы была исследована в работах

С.В.Стовбуна и соавторов. Было отмечено образование жестких спиральных структур (так называемых струн) в гомохиральных растворах трифторацетилованных аминокспиртов (ТФААС) в циклогексане, кумоле и других растворителях [6]. За счет хирально обусловленных диполь-дипольных и Ван-дер-Ваальсовых стереоспецифических взаимодействий изомер одного из аминокспиртов формирует левую хиральную струну, которая в свою очередь свивается в правую суперспираль. Наглядно демонстрируется спонтанная тенденция исходно гомохиральной системы мономеров сформировать знакопеременную иерархию спиральных структур.

Корнелиссен и соавторы (1998г.) показали, что суперамфифилы, состоящие из изоцианопептидов (гидрофильного блока) и полистирола (гидрофобного блока) могут собираться в воде в палочкообразные мицеллы, везикулы и спиральные агрегаты. Сначала формируются мицеллярные палочки, состоящие из полистиролового ядра и поверхности, образованной правыми спиральными полиизоцианидами. Затем эти палочки собираются в левые суперспиральные волокна.

Возможность иерархической самосборки дискообразных молекул с хиральными хвостами в одиночные спиральные структуры продемонстрирована в работе Элеманса и др. (2003г.). Несущие хиральные алифатические хвосты молекулы фтороцианина с краун-эфирными фрагментами собираются в правые спиральные стопки в хлороформе. Эти правые спиральные структуры затем собираются в левые суперспирали.

В *холестерических жидких кристаллах*, образованных левыми холестериноподобными молекулами, формирующими пакет двумерных планарных структур, можно проследить, что директор вращается вокруг холестерической оси, образуя правую спираль [7].

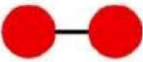
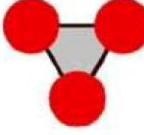
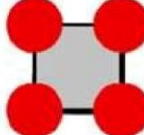
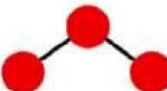
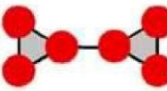
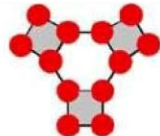
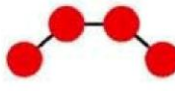
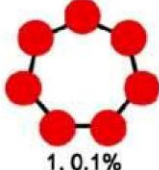
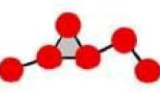
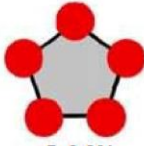
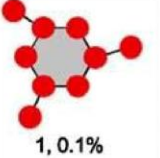
В холестерической фазе ДНК также наблюдается смена знака хиральности при переходе на более высокий уровень организации (уже «справа налево») [8]. Холестерическая фаза представляет собой стандартно организованные параллельные слои молекул ДНК. Каждый слой поворачивается относительно предыдущего на небольшой угол. Из экспериментальных данных следует, что правозакрученная ДНК образует слои, которые в свою очередь формируют левозакрученную спираль.

Приведенные примеры иллюстрируют правило смены знака хиральности при переходе на следующий уровень структурной иерархии. Выявленная закономерность, по всей видимости, представляет собой единственный установленный на сегодняшний

день симметрический инвариант, который отвечает сопряжению предбиологических и биологических систем в процессе биопоза [1]. Это явление пришло из неживой природы в живую. В целом, обнаруженное явление смены знака хиральности в неживых системах, по-видимому, можно считать общей физической закономерностью структурообразования в исходно гомохиральных системах.

Третья глава посвящена описанию особенностей формирования знакопеременных хиральных иерархий структур в белках и, для сравнения, в ДНК. Как известно, первичная структура белков представляет собой последовательность L-аминокислотных остатков. Образуя вторичную структуру, полипептидная цепь может укладываться в правую α -спираль или в «правопропеллерный» β -лист. На уровне третичной структуры особый интерес представляют суперспирали (coiled-coil). Для выявления возможных типов суперспирализации по знаку хиральности нами были проанализированы доступные белковые структуры [9]. Практически во всех случаях, когда визуально наблюдалось внутримолекулярное перекрытие α -спиралей, была выявлена тенденция их свивания в левую суперспираль. В простейшем случае для суперспирали, состоящей из двух α -спиралей, характерна левая укладка практически во всех структурах разных классов белков. В таблице 1 отражены сведения о количестве структур типа coiled-coil различных классов, обладающих мотивом левой укладки.

Все структуры суперспиралей разделены на 5 основных классов: на основе 2-х, 3-х, 4-х, 5-ти и 6-ти α -спиралей. В первом столбце приведены диаграммы строения структуры суперспирали, под диаграммой в этой же ячейке указано количество этих структур в базе данных и встречаемость такого типа структур. Во втором столбце приводится количество структур этого типа, которые обладают мотивом левой укладки, и доля таких структур в данном классе. Эти оценки были получены путем визуального анализа 3D-моделей белковых структур из базы данных CC+. Выявленные закономерности формирования третичных структур позволяют представить их в виде «периодической таблицы» с учетом числа взаимодействующих спиралей и знака хиральных структур в иерархиях.

На основе 2-х α -спиралей		На основе 3-х α -спиралей		На основе 4-х α -спиралей	
Диаграмма строения, количество структур и встречаемость*	Количество структур с мотивами левой укладки	Диаграмма строения, количество структур и встречаемость*	Количество структур с мотивами левой укладки	Диаграмма строения, количество структур и встречаемость*	Количество структур с мотивами левой укладки
 751	751, 100%	 118, 11.6%	42, 36%	 68, 6.8%	17, 68%
 35, 3.5%	7, 20%	 5, 0.5%	3, 60%	 1, 0.1%	В структуре наблюдается мотив** левой укладки
 17, 1.7%	5, 29%	 2, 0.2%	В обеих структурах наблюдается мотив** левой укладки	На основе 5-ти α -спиралей	
 1, 0.1%	1, 100%	 1, 0.1%	В структуре наблюдается мотив** левой укладки	 5, 0.6%	4, 80%
		 1, 0.1%	В структуре наблюдается мотив** левой укладки	На основе 6-ти α -спиралей	
				 1, 0.1%	В структуре наблюдается мотив** левой укладки

* Moutevelis E. and Woolfson D. A Periodic Table of Coiled-Coil Protein Structures. J. Mol. Biol. **385**, 726 (2009).

**Нельзя визуально зафиксировать межмолекулярные взаимодействия α -спиралей, но мотив левой укладки прослеживается.

Таблица 1. Типы структур левых суперспиралей в белках (по данным из [4, 9])

Нами был проведен анализ распределения белков, содержащих суперспираль определенных типов (на основе 2-х, 3-х и 4-х α -спиралей), по функциональным классам. Для простейшего случая (белок содержит суперспираль из двух α -спиралей) отмечено преобладание ферментов (44%, рисунок 1). То же отмечено и для белков с другими наиболее часто встречающимися типами суперспиралей – на основе 3-х и 4-х α -спиралей – 25-39%. Этот результат определенным образом конкретизирует

положение о «выделенных механических степенях свободы» в концепции «белок-фермент-машина» [1].

На уровне третичной структуры из анализа доступных данных нами отмечены следующие тенденции в структурообразовании белков: в фибриллярных белках взаимодействующие правые α -спирали, как правило, образуют левую суперспираль; в отдельных структурах мембранных белков отмечена тенденция образования левой суперспирали из правых α -спиралей, но это скорее исключение, а не правило – чаще всего укладка α -спиралей почти параллельна; в глобулярных белках суперспирали (coiled-coil) как элементы третичной структуры имеют всегда левый знак хиральности.

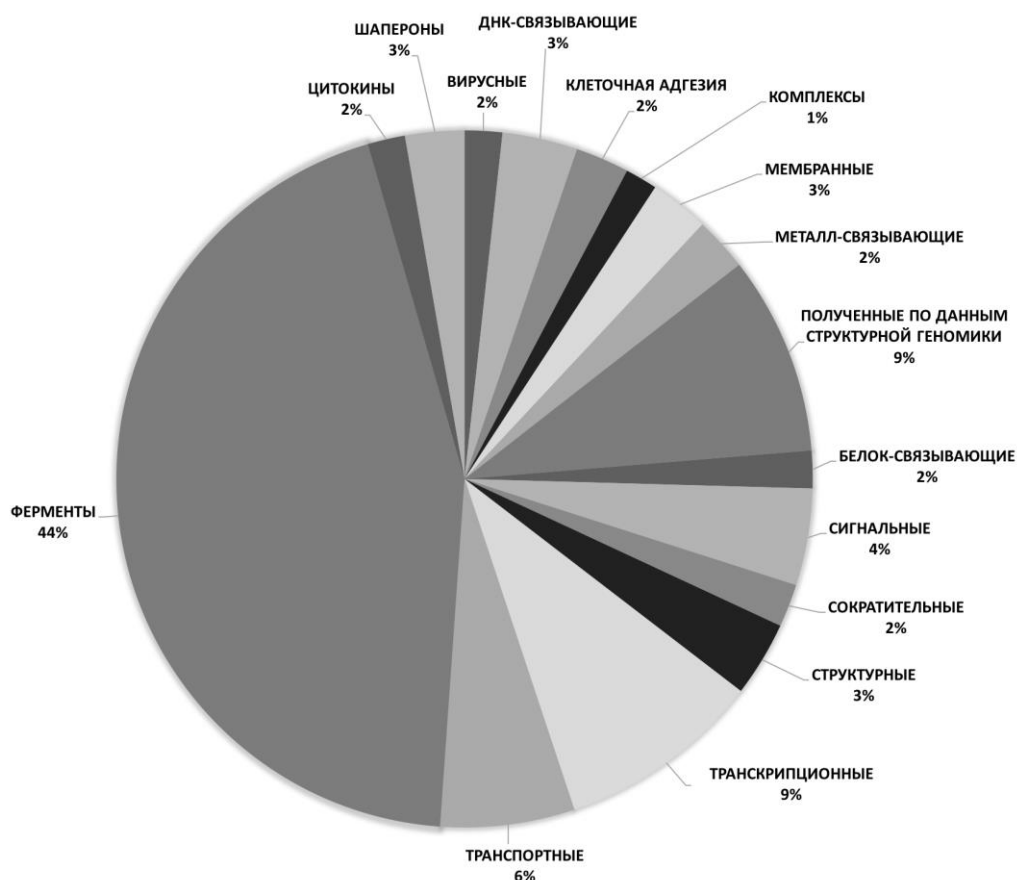


Рисунок 1. Диаграмма распределения белков, содержащих суперспираль из двух α -спиралей, по функциональным классам

Анализ базы данных PDB позволил охарактеризовать переходы от третичной к четвертичной структуре со сменой знака хиральности на примере белков мышечного саркомера и моторных белков. Так, левая суперспираль тропомиозина обвивает правую двухцепочечную спираль F-актина правым образом, меняя знак хиральности при переходе на четвертичный уровень. Хвосты миозина II – левые суперспирали из правых α -спиралей - собираются в правозакрученный пучок – миозиновую фибриллу,

и, следовательно, при переходе на четвертичный уровень тоже меняется знак хиральности. При мышечном сокращении правозакрученная миозиновая фибрилла взаимодействует с правозакрученной актиновой фибриллой. Здесь проявляется одинаковость знаков хиральности при белок-белковых взаимодействиях.

Таким образом, в макромолекулярных системах в работах нашей научной группы впервые были выделены как хиральные инварианты знакопеременные иерархии хиральных структур в последовательностях от «нижнего» ассиметричного атома углерода в sp^3 -гибридизации до суперспиралей и надмолекулярных структур [1]. Показано чередование знака хиральности L-D-L-D при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации белковых структур (см. рисунок 2). Первичная структура белков – неразветвленная одномерная цепочка L-аминокислотных остатков, - образуя вторичную структуру, укладывается в правую α -спираль. Практически во всех случаях, когда визуально наблюдается внутримолекулярное тесное перекрытие α -спиралей на уровне третичной структуры, выявлена однозначная тенденция их свивания в левую суперспираль. Четвертичная структура белков представлена надмолекулярными структурами, сформированными преимущественно при правой укладке левых суперспиралей.

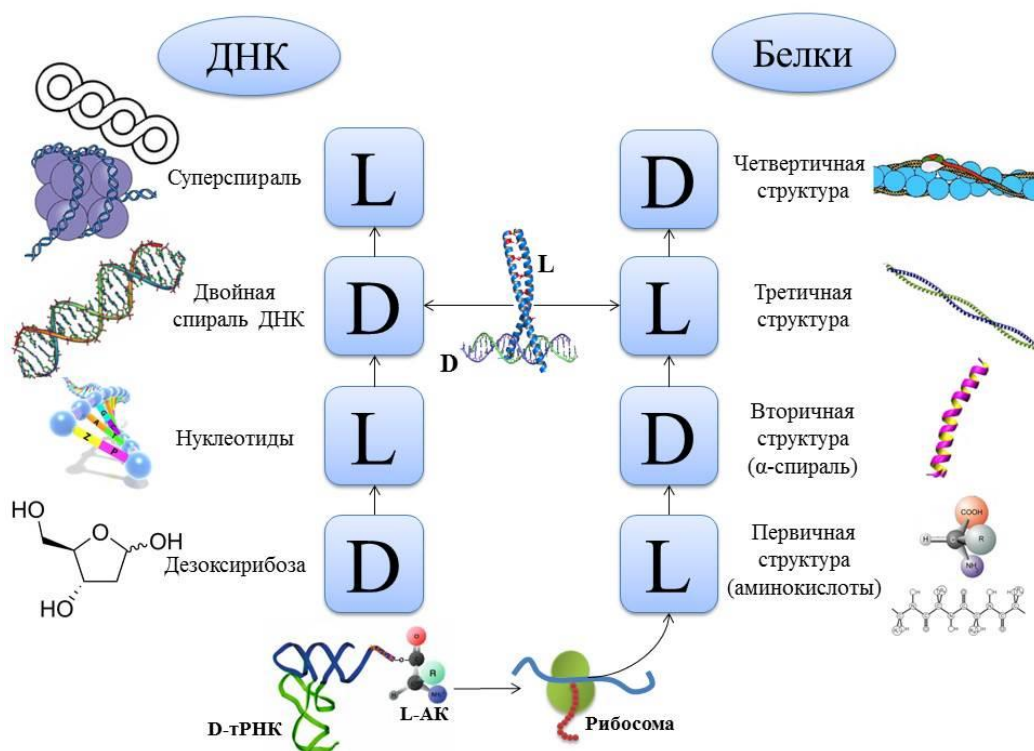


Рисунок 2. Периодическая таблица знакопеременных иерархий хиральных/спиральных структур от первичной до четвертичной для ДНК (левая колонка) и белков (правая колонка): L – левая конфигурация энантиомера или спирали, D – правая

Что касается смены типов симметрии при переходе от аминокислот первичной структуры к спиральям вторичной структуры, нужно отметить следующее: в обоих случаях «правизна» и «левизна» определяются обходом по или против часовой стрелки. Согласно правилам Кана-Ингольда-Прелога, конфигурация соединения считается правой (R), если направление убывания старшинства заместителей у асимметрического центра совпадает с движением по часовой стрелке, и левой (S), если против часовой стрелки. То же и в спиральях – под «правыми» спиральями понимают те, ход которых по направлению от нас идет по часовой стрелке, а «левыми» - против часовой. Подобное соответствие связано с определениями знака хиральности, однако в данном случае оно является универсальным и удобным для нашего анализа.

Кроме того, для наиболее распространённой В-формы ДНК отмечено чередование знака хиральности D-L-D-L при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации [1]. Так, соединенные фосфодиэфирными связями молекулы дезоксирибозы, являются D-изомерами. Включающие их нуклеотиды находятся преимущественно в левой гош-конформации, позволяющей за счет их комплементарного соединения водородными связями образовывать правую двойную спираль ДНК, составляющую следующий уровень организации. Свойственная полугибким полимерным цепям ДНК последующая сверхспирализация проявляется в левой укладке правых двойных спиралей, что можно наблюдать у прокариот. У эукариот «правая» двойная спираль ДНК обвивает гистоновый октамер «левым» образом.

Следует подчеркнуть, что в качестве первичной структуры для ДНК мы рассматриваем линейную последовательность молекул дезоксирибозы, а не, как принято, нуклеотидов. Вызвано это необходимостью сравнить подобные друг другу структурные уровни ДНК и белков по знакам хиральности. Важно отметить, что между столбцами ДНК и белков наблюдается сдвиг на половину периода.

В четвертой главе рассмотрены биофизические аспекты и следствия выдвинутого в работе фундаментального положения относительно того, что гомохиральность первичных структур белков, составленных L-аминокислотами, а также нуклеиновых кислот, составленных D-рибозой и D-дезоксирибозой, в термодинамическом отношении служит депо (резервуаром) свободной энергии, которая может быть использована макромолекулами в ходе возможных структурных

превращений. Левая гомохиральная полипептидная цепь (первичная структура белка) становится одномерной активной средой с распределенным ресурсом свободной энергии, диссипация которого сопряжена с формированием структурных иерархий. Ранее гомохиральность пептидной цепи белков никогда не рассматривалась в литературе как источник свободной энергии для структурных перестроек. Что касается биомиметических хиральных структур, которые мы обсуждали во второй главе, то там свободная энергия по энтропийной составляющей закладывается при искусственном формировании начальной гомохиральности элементов систем.

Спонтанная рацемизация исходно гомохиральных веществ есть диссипативный процесс с понижением свободной энергии. Знак хиральности изменяется, но тип симметрии не изменяется. По смыслу этот процесс можно назвать «горизонтальной рацемизацией», происходящей на одном уровне структурной организации. Но, в принципе, возможен и другой путь диссипации, когда гетерохиральность появляется за счет формирования более крупных молекулярных структур противоположного знака хиральности, сформированных из исходных элементов, сохраняющих свой знак хиральности. Это могут быть или внутримолекулярные регулярные образования, или надмолекулярные, супрамолекулярные, структуры. Система «размазывает» свою гомохиральность, понижая свободную энергию, и это сопровождается появлением у части или всех макромолекул более стабильного, долгоживущего каркаса. Это случай, с которым мы имели дело в неживых системах и с которым встречаемся в молекулярной биологии, по существу, является «вертикальной рацемизацией».

К этому классу явлений следует отнести процесс фолдинга – процесс укладки первичных цепей макромолекул белков и нуклеиновых кислот в пространственно уникальную, функционально специфичную конфигурацию. Объяснение известного парадокса Левинталя основывают на предположении о существовании энергетической воронки в конфигурационном пространстве на поверхности потенциальной энергии со сложным ландшафтом [2,3]. Считается, что эта воронка, характеризующаяся минимумом свободной энергии, задаёт направление траектории фолдинга в конфигурационном пространстве макромолекулы, проходящей через цепочку локальных минимумов энергии. Однако, в известных моделях не закладывается причина тенденции направления сворачивания одномерной гомохиральной цепи в хиральную вторичную структуру. Нам представляется, что развиваемый в литературе

подход может быть дополнен и конкретизирован физическим механизмом, связанным с представлениями о блочной последовательной укладке хиральных структур следующего уровня с изменяющимся знаком хиральности. Рассмотрим поэтапные изменения свободной энергии при отборе L-аминокислот и формировании иерархической структуры.

Энергетическая стоимость образования первичной структуры – левой гомохиральной цепочки. В соответствии с формулой Шеннона энтропию можно описать следующим образом:

$$S = -k \sum_i p_i \ln p_i.$$

При рацемизации одного из энантиомеров хирального соединения энтропия описывается как:

$$S = -k [p_D \ln p_D + p_L \ln p_L],$$

где $p_D = p_L = \frac{1}{2}$ - вероятности случайного выбора из смеси D- или L-изомера, k - постоянная Больцмана.

Изменение свободной энергии при постоянной температуре и постоянном давлении имеет только энтропийную составляющую. Для хирально чистой системы приходящаяся на одну частицу энтропия $S = 0$.

Тогда изменение энтропии при выборе L- и D-изомеров из рацемической смеси в пересчете на одну частицу и соответствующее изменение свободной энергии:

$$\Delta S = -k * \ln 2 \simeq -0,7k,$$

$$(-T\Delta S)_I = 0,7kT \approx 2,9 * 10^{-21} \text{ Дж} \approx 0,42 \text{ ккал/моль}.$$

Количество хиральных частиц в объемной фазе клетки составляет

$$N = N_A \frac{4\pi r^3 \rho}{300} \sum_{i=1}^3 \frac{w_i}{M_i},$$

где r – радиус клетки, ρ - ее средняя плотность, w_i – массовые доли (%) органических веществ ($i = 1, 2, 3$ для нуклеиновых кислот, углеводов и белков) [10]. Детальный химический состав клетки, безусловно, зависит от ее типа, однако данные для любой хорошо изученной клетки могут быть использованы для оценок. Известны данные по химическому составу клетки *E.coli* (% масс.): углеводы – 3, белки – 15, РНК – 5, ДНК – 1 (см. [10]). Среднюю молекулярную массу (в а.е.м.) аминокислоты можно принять равной 115. Размер клетки возьмем 6 мкм - соответствующий значению,

промежуточному между типичными размерами эукариот и прокариот. Плотность клетки примем равной плотности воды. Тогда энергетическая стоимость хиральной чистоты белков:

$$\Delta G_{T,P} = 0,7k * T * N_A \frac{4\pi r^3 \rho}{300} * \frac{w_1}{M_1} = \frac{2.8\pi r^3 \rho RT}{300} * \frac{w_1}{M_1} \approx 2.6 * 10^{-13} \text{ Дж.}$$

Данные расчеты сделаны для простейшего случая – когда изменение свободной энергии системы связано исключительно с изменением энтропии. Рассмотрена только «информационная» компонента, связанная с разделением смеси L- и D-энантиомеров аминокислот.

Энергия гидролиза АТФ до АДФ и неорганического фосфата в физиологических условиях равна приблизительно -50 кДж/моль [11]. В случае четырех гидролизуемых макроэнергетических связей изменение свободной энергии $\Delta G_{\text{АТФ}} = -3.3 * 10^{-19}$ Дж. Изменение свободной энергии при выборе L-изомеров из рацемата в пересчете на одну частицу $(-T\Delta S)_I \approx 2,9 * 10^{-21}$ Дж отличается от энергии гидролиза АТФ $\Delta G_{\text{АТФ}} = -8.3 * 10^{-20}$ Дж примерно на два порядка.

Энергетическая стоимость образования вторичной структуры – правой α -спирали из L-аминокислот. Изменение энтропии при отборе аминокислот, образующих правую α -спираль, из L-изомеров в пересчете на одну частицу составляет:

$$\Delta S = k * [p \ln p + (1 - p) \ln(1 - p)] \approx -0,65k,$$

где $p = 0,35$ - вероятность выбора L-аминокислоты, которая входит в полипептидную цепь α -спирали.

Тогда соответствующее изменение свободной энергии в пересчете на одну частицу $(-T\Delta S)_{II} = 0,65kT \approx 2.7 * 10^{-21}$ Дж ≈ 0.38 ккал/моль.

Рассмотрим энтальпийную составляющую. Свободная энергия образования водородной связи и сопутствующих ей взаимодействий в α -спирали равна -2 ккал/моль [17], что в пересчете составляет $-1.4 * 10^{-20}$ Дж.

Получается, что изменение энергии при отборе аминокислот, образующих правую α -спираль, из L-изомеров в пересчете на одну частицу $(-T\Delta S)_{II} \approx 2,7 * 10^{-21}$ Дж отличается от свободной энергии образования водородной связи в α -спирали $\Delta H = -1.4 * 10^{-20}$ Дж тоже примерно на порядок.

Пересчитаем соответствующее изменение свободной энергии на «структурную единицу хиральности» – виток. Изменение энтропии при отборе аминокислот, образующих правую α -спираль, из L-изомеров в пересчете на виток составляет:

$$\Delta S = k * [p \ln p + (1 - p) \ln(1 - p)] \simeq -0,3k,$$

где $p = 0,0875$ - вероятность выбора L-аминокислоты, которая входит в полипептидную цепь α -спирали.

Соответствующее изменение свободной энергии в пересчете на один виток:

$$(-T\Delta S)_{II} = 0,3kT \approx 12,4 * 10^{-22} \text{ Дж} \approx 0,18 \text{ ккал/моль.}$$

Энергетическая стоимость образования третичной структуры – левой суперспирали из правых α -спиралей. Изменение энтропии при отборе правых α -спиралей, образующих левую суперспираль, в пересчете на одну частицу составляет:

$$\Delta S = k * [p \ln p + (1 - p) \ln(1 - p)] \simeq -0,12k,$$

где $p = 0,025$ - вероятность выбора правой α -спирали, которая входит в состав левой суперспирали.

Тогда соответствующее изменение свободной энергии в пересчете на одну частицу:

$$(-T\Delta S)_{III} = 0,12kT \approx 5 * 10^{-22} \text{ Дж} \approx 0,07 \text{ ккал/моль.}$$

В пересчете на «структурную единицу хиральности» – виток изменение энтропии:

$$\Delta S = k * [p \ln p + (1 - p) \ln(1 - p)] \simeq -0,01k,$$

где $p = 0,001$ - вероятность выбора правой α -спирали, которая входит в состав левой суперспирали.

$$(-T\Delta S)_{III} = 0,01kT \approx 0,4 * 10^{-22} \text{ Дж} \approx 0,006 \text{ ккал/моль.}$$

На примере лейциновой молнии исследовано связывание гетеродимера c-Fos–c-Jun [12]. Из этой работы известно, что экспериментально установленная свободная энергия связывания гетеродимера c-Fos–c-Jun составляет -4,1 ккал/моль (кулоновские и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия). В пересчете на мономер $\Delta G = -40 * 10^{-22}$ Дж. Результаты расчетов представлены в Таблицах 1 и 2.

Нами получены самые приблизительные оценки по изменениям энтальпийной и энтропийной составляющих свободной энергии при иерархическом структурообразовании в макромолекуле белка. Мы учитывали далеко не все факторы, относящиеся к этим компонентам свободной энергии. Нас интересовало их

соотношение для оценки влияния на формирование стабильных иерархических уровней. В среднем они отличаются примерно на порядок. Это соотношение определенным образом может свидетельствовать о том, что симметричная (хиральная) компонента свободной энергии может служить фактором, определяющим правый и левый мотивы сворачивания полипептидной цепи в α -спирали и α -спиралей в суперспирали. Тогда как непосредственные внутримолекулярные взаимодействия (водородные связи, кулоновские и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия) закрепляют их в качестве стабильных структур.

	$\Delta H, * 10^{-22}$ Дж	$-T\Delta S, * 10^{-22}$ Дж
Образование первичной структуры – левой гомохиральной цепочки	-3300	29
Образование вторичной структуры – правой α -спирали из L-аминокислот	-140	27
Образование третичной структуры – левой суперспирали из правых α -спиралей	-40	5

Таблица 1. Результаты расчетов по изменениям энтальпийной и энтропийной составляющих свободной энергии в пересчете на одну аминокислоту

	$\Delta H, * 10^{-22}$ Дж	$-T\Delta S, * 10^{-22}$ Дж
Образование первичной структуры – левой гомохиральной цепочки	-3300	29
Образование вторичной структуры – правой α -спирали из L-аминокислот	-560	12.4
Образование третичной структуры – левой суперспирали из правых α -спиралей	-200	0.4

Таблица 2. Результаты расчетов по изменениям энтальпийной и энтропийной составляющих свободной энергии в пересчете на «структурную единицу хиральности» – виток

В целом, наш подход к описанию фолдинга является развитием представлений О.Б.Птицына и А.В.Финкельштейна относительно стадийности процесса самоорганизации. С точки зрения физических механизмов он может быть рассмотрен в представлениях активных сред. Первую стадию процесса самоорганизации – сворачивание левых аминокислотных остатков полипептидной цепи в правую α -спираль – мы предлагаем в динамике рассматривать как автоволновой процесс

самоорганизации в активной среде с распределенным ресурсом свободной энергии. Ресурс – в неравновесности гомохирального состояния. Вторую и дальнейшие стадии самоорганизации, на наш взгляд, имеет смысл рассматривать уже не как процесс самоорганизации в гомогенной среде, а как самосборку деталей молекулярных конструкций, каждая из которых имеет характерные симметрические особенности, связанные с хиральностью. Иерархия хиральных структур, как представляется, может определять различные типы, анизотропность и масштабы конформационной подвижности, связанной с ферментативной активностью, рецепцией, подстройкой при межмолекулярных комплементарных взаимодействиях и пр.

С физической точки зрения принципиальное отличие «живого» от «неживого» состоит в том, что живые системы в качестве активных элементов используют молекулярные и макроскопические машины, преобразующие тип энергии, вещество или информацию [1]. В неживой природе машин нет, есть только преобразователи, которые не предназначены производить «полезную» работу. К элементам конструкций молекулярных машин относят «жесткие» фермы, а также системы рычагов и шарниры, которые обладают возможностью передавать силу (энергию) внутри конструкции по выделенным степеням свободы. Спираль – уникальный и простейший нелинейный элемент конструкций молекулярных машин. По всей видимости, именно по этой причине мы отмечаем обилие спиральных структур разного уровня, характерное для ферментов, особенно, для макромолекулярных энергопреобразующих устройств, ответственных за процессы биологической подвижности в клетках или же за транспортные процессы в мембранах. Для реализации цикличности как принципиальной временной характеристики в «машине» предполагается обязательное наличие симметрий в конструкции, а для движения по контуру цикла в «правильном» направлении – несимметричного элемента, обладающего свойством «вентили» или «защелки». Можно предполагать, что внутримолекулярные и надмолекулярные спиральные структуры не только служат для молекулярных машин жесткими конструкциями, позволяющими реализовать «выделенные механические» степени свободы, но и становятся теми вентильными устройствами, которые обуславливают однонаправленное движение по циклу для молекулярных машин. Поэтому мы считаем, что любая молекулярная машина является хиральным объектом – энантиоморфом: цикличность её работы предполагает однонаправленность цикла. Идея относительно

хиральности (молекулярных) машин достаточно нестандартна и, по-видимому, ранее не обсуждалась в литературе.

В пятой главе рассмотрена концепция периодической таблицы молекулярной биологии, представленной на рисунке 2, которая, по-видимому, отражает важное свойство межмолекулярных соответствий: однотипные макромолекулы имеют тенденцию взаимодействовать в пространстве одного типа хиральных классов, L или D, а разнотипные – в комплементарных парах разнозначных хиральных энантиоморфов. Имеющиеся наблюдения позволяют предполагать, что при межмолекулярных взаимодействиях в каждой из молекул доминирует знак хиральности внутримолекулярной структуры высшего уровня, непосредственно участвующей во взаимодействиях. Для однотипных молекул (белок-белок, ДНК-РНК, тРНК-мРНК, рибозимы) взаимодействие преимущественно реализуется в пределах одного знака хиральности L-L или D-D, а для разнотипных молекул (ДНК-белок, тРНК-аминокислоты, фермент-субстрат) — в случае разного знака D-L или L-D.

Не менее важным, уже прикладным, аспектом обсуждаемой проблемы относительно системной роли хиральности в межмолекулярных взаимодействиях является выявление особенностей взаимодействия хиральных лекарственных препаратов с макромолекулярными мишенями клеток, где также необходимо включать в рассмотрение одноименные или разноименные хиральные соответствия партнеров.

В общем случае, по-видимому, можно считать, что с точки зрения хиральности молекулярная биология является периодической системой иерархий знакопеременных хиральных структур, а центральный блок, состоящий из четырех структурных уровней белков и ДНК, образует замкнутый ахиральный инвариант. Им завершается уровень молекулярной биологии и открывается цитологический уровень.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1. Выявлена и на конкретных материалах обоснована новая физическая закономерность, согласно которой гомохиральные системы имеют тенденцию к формированию хирально знакопеременных структурных иерархий.
2. Проведено обоснование гипотезы относительно существования структурных иерархий в белковых молекулах, характеризующихся сменой знака хиральности (спиральности), - L-D-L-D. Выполнен качественный и количественный анализ

спиральных и суперспиральных структур в белках по материалам баз данных PDB, CC+. Составлена «периодическая таблица левых суперспиралей». Получены количественные оценки наличия мотива левого свивания для каждого ранга суперспиралей. По аналогии проведен анализ хирально знакопеременного иерархического структурообразования в нуклеиновых кислотах - D-L-D-L.

3. Проведен термодинамический анализ формирования гомохиральной первичной структуры белков из смеси энантиомеров аминокислот. Гомохиральность первичной структуры обуславливает создание распределенного запаса свободной энергии в полипептидной цепи. Выполнена оценка энергетической стоимости хиральной чистоты белков: $\Delta G_{T,P} \approx 2.6 * 10^{-13}$ Дж.
4. Выполнен термодинамический анализ формирования иерархий знакопеременных хиральных структур белков с изменяющимися масштабами, симметриями и функциями (в пересчете на «структурную единицу хиральности» – виток $(-T\Delta S)_I \approx 2.9 * 10^{-21}$ Дж, $(-T\Delta S)_{II} \approx 1.2 * 10^{-21}$ Дж, $(-T\Delta S)_{III} \approx 4 * 10^{-23}$ Дж). Показано, что симметричный (энтропийный) фактор, связанный с гомохиральностью первичной структуры, служит направляющим в процессе фолдинга.
5. Развита концепция фолдинга белка как выделенной траектории самоорганизации гомохиральной полипептидной цепи с учетом формирования знакопеременной хиральной иерархии внутри- и надмолекулярных структур в процессе диссипации свободной энергии, связанной с ее энтропийной составляющей.
6. Проанализирована концепция «белок – машина» с позиций хирально обусловленной стратификации в иерархиях белковых структур, формирующих «выделенные механические степени свободы».
7. Проведен анализ гипотезы относительно системного представления молекулярной биологии как периодической системы знакопеременных хиральных структур.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Твердислов В.А. Хиральность как первичный переключатель иерархических уровней в молекулярно-биологических системах. // Биофизика, 2013, том 58, вып. 1, с. 159–164.
2. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами. – 3-е изд., испр. и доп. // М.: КДУ, 2005. – 456 с.

3. Шайтан К.В., Ложников М.А., Кобельков Г.М. Релаксационный фолдинг и принцип минимума скорости диссипации энергии для конформационных движений в вязкой среде. // Биофизика, 2016, том 61, вып.4, с. 629-637.
4. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. The Protein Data Bank. // Nucleic Acids Research, 2000, 28, pp. 235-242.
5. Testa O.D., Moutevelis E., Woolfson D.N. CC+: a relational database of coiled-coil structures. // Nucleic Acids Res. 2009. 37. D315-D322.
6. Стовбун С.В., Михалева М.Г., Скоблин А.А., Твердислов В.А. Структурообразование в хиральных системах. Супрамолекулярные струны / Под ред. В.А. Твердислова. – М.: Физический факультет МГУ, 2016. – 312 с.
7. Шибаев В.П. Кентавры природы – жидкие кристаллы. // Природа, 2012, 1, с.61-69.
8. Livolant F., Leforestier A. Condensed phases of DNA: Structures and phase transitions. // Progress in polymer science, 1996, 2, pp.1115-1164.
9. Moutevelis E., Woolfson D. A periodic table of coiled-coil protein structures. // J. Mol. Biol., 2009, 385, pp.726-732.
10. Твердислов В.А., Сидорова А.Э., Яковенко Л.В. Биофизическая экология. // М.: КРАСАНД, 2012. — 544 с.
11. Кольман Я., Рем К. Наглядная биохимия. // М.: Мир, 2000 – 469 с.
12. Zuo ZL., Guo L., Mancera R.L. Free Energy of Binding of Coiled-Coil Complexes with Different Electrostatic Environments: The Influence of Force Field Polarisation and Capping. // Nat. Prod. Bioprospect., 2014, 4, pp.285-295.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI:

1. Твердислов В.А., **Малышко Е.В.**, Ильченко С.А. От автоволновых механизмов самоорганизации к молекулярным машинам. // Известия РАН. Серия физическая, 2015, т.79, № 3, с. 1728-1732. RSCI (Импакт-фактор 0,438).
2. **Malysenko E.V.**, Tverdislov V.A. Chirality as a physical aspect of structure formation in biological macromolecular systems. // IOP Journal of Physics: Conference Series, 2016, v.741, № 1, 012065. Scopus (SJR 0.241).
3. Твердислов В.А., **Малышко Е.В.**, Ильченко С.А., Жулябина О.А., Яковенко Л.В. Периодическая система хиральных структур в молекулярной биологии. // Биофизика, 2017, т. 62, №. 3, с. 421–434. Scopus, RSCI (Импакт-фактор 0,852).

4. **Malyshko E.V.**, Tverdislov V.A. Physical Principles of Discrete Hierarchies Formation in Protein Macromolecules. // IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series, 2017, v.917, 42025. Scopus (SJR 0.241).

В рецензируемых научных изданиях:

5. Твердислов В.А., **Малышко Е.В.**, Ильченко С.А., Скурида В.Д. От автоволновых механизмов самоорганизации к биологическим машинам. // Учёные записки физического факультета МГУ, 2015, 4, 154350

6. Жулябина О.А., **Малышко Е.В.**, Ильченко С.А., Твердислов В.А. Хиральность в структурной организации биомакромолекул. // Вестник науки и образования, 2015, № 4(6), с.24-25.

7. Твердислов В.А., **Малышко Е.В.** Хиральный дуализм как системный фактор иерархического структурообразования в молекулярно-биологической эволюции. // Сложность. Разум. Постнеклассика, 2016, № 1, с. 78-83.

8. **Малышко Е.В.**, Твердислов В.А. Молекулярные машины как иерархические хиральные конструкции. // Актуальные вопросы биологической физики и химии, 2018, том 3, № 3, с. 526-530.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ НА МЕЖДУНАРОДНЫХ И ВСЕРОССИЙСКИХ НАУЧНЫХ КОНФЕРЕНЦИЯХ:

1. **Малышко Е.В.** Механические модели спиральных структур в биомакромолекулах. XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015". Секция "Физика", Физический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, 13-17 апреля 2015;

2. **Малышко Е.В.** Особенности структурообразования в биологических и модельных хиральных системах. Международный научный форум молодых ученых «Наука будущего – наука молодых», Севастополь, Россия, 29 сентября - 2 октября 2015;

3. **Malyshko E.V.**, Tverdislov V.A. Chirality as a Physical Aspect of Structure Formation in Biological Macromolecular Systems. 3rd International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures "Saint Petersburg OPEN 2016", Санкт-Петербург, Россия, 28-30 марта 2016.

4. Твердислов В.А., **Малышко Е.В.**, Жулябина О.А., Ильченко С.А., Яковенко Л.В. Хиральный дуализм как системный фактор в молекулярной биологии. XI Международная научно-техническая конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии» БФФХ - 2016, СевГУ, Севастополь, Россия, 25-29 апреля 2016;

5. **Малышко Е.В.**, Твердислов В.А. Симметрии в иерархиях хиральных блоков внутримолекулярных структур белков. Международная научная конференция "Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем" и XII съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, Беларусь, 28-30 июня 2016;
6. **Малышко Е.В.**, Твердислов В.А. Хиральная лестница во внутримолекулярных структурах белков. XVI Ежегодная международная молодежная конференция «Биохимическая физика» ИБХФ РАН-ВУЗы, Москва, Россия, 24-26 октября 2016;
7. **Malyshko E.V.**, Tverdislov V.A. Physical Principles of Discrete Hierarchies Formation in Protein Macromolecules. 4th International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures "Saint Petersburg OPEN 2017", Санкт-Петербург, Россия, 3-6 апреля 2017;
8. **Малышко Е.В.** Физические принципы образования дискретных иерархий в макромолекулах белка. XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2017". Секция "Физика", Физический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, 10-14 апреля 2017;
9. **Малышко Е.В.**, Твердислов В.А. Хиральные иерархии белковых структур как инструмент фолдинга. XII Международная научно-техническая конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2017», Севастополь, Россия, 2-6 октября 2017;
10. **Малышко Е.В.**, Твердислов В.А. Хиральность, структурные иерархии и фолдинг белков. Международная научная конференция "Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем" и XIII съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Беларусь, 27-29 июня 2018.
11. **Малышко Е.В.**, Твердислов В.А. Хиральный дуализм как системный фактор иерархического структурообразования в белках. XVII Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы "Биохимическая физика", Москва, Россия, 13-15 ноября 2017;
12. Ильченко С.А., **Малышко Е.В.**, Скурида В.Д., Твердислов В.А. Хиральный каркас биомолекул. V съезд биофизиков России, Ростов-на-Дону, Россия, 4-10 октября 2015;
13. **Малышко Е.В.**, Твердислов В.А. Фолдинг белков как процесс автоволновой самоорганизации в активных средах. XVI Всероссийская школа-семинар "Волновые явления в неоднородных средах" имени профессора А.П. Сухорукова ("Волны-2018"), Красновидово, Моск. обл., Россия, 27 мая - 1 июня 2018.