

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЫ [Нур³]МЕТ-ГАЛЛАТОСТАТИНА

Л.И. ВЕЛИЕВА, И.Н. АЛИЕВА, Д.И. АЛИЕВ, Н.М. ГОДЖАЕВ

Бакинский Государственный Университет им. М.Э. Расулзаде

370145, г. Баку, ул. З. Халилова, 23

Методом теоретического конформационного анализа изучено пространственное строение молекулы [Нур³]Мет-галлатостатина нейропептида, выделенного из некоторых видов насекомых. Изучена конформационная подвижность боковых цепей составляющих молекулу аминокислотных остатков. Показано, что низкоэнергетические конформационные состояния молекулы представлены структурами со свернутыми формами N-концевого пентапептидного фрагмента молекулы.

ВВЕДЕНИЕ

Галлатостатины - нейропептиды выделенные из экстрактов насекомых - "Calliphora vomitoria", "Periplaneta americana" и "Diptera punctata" относятся к семейству соединений, функциональная активность которых связана с их способностью ингибировать синтез и выделение ювенильных гормонов [1-2]. Исследования структуры и свойств таких соединений, проведенные до настоящего времени, позволили установить, что функциональные особенности галлатостатинов связаны с наличием в их первичной структуре специфической последовательности аминокислотных остатков Gly-Pro-Pro-Tyr-Asp-Phe-Gly-Met-NH₂, названной Мет-галлатостатином. Замена пролина его гидроксильным аналогом в молекуле Мет-галлатостатина ([Нур³]Мет-галлатостатин) приводит к резкому усилению ингибиторных свойств этого соединения. Указанный фактор сыграл определяющую роль при выборе [Нур³]Мет-галлатостатина в качестве объекта исследований при изучении методом теоретического конформационного анализа пространственного строения и молекулярных механизмов функционирования соединений указанного семейства.

МЕТОД РАСЧЕТА

В методе теоретического конформационного анализа исследуемый объект рассматривается в виде системы взаимодействующих между собой атомов, устойчивые состояния которой соответствуют минимальным значениям внутримолекулярной конформационной энергии всей молекулы. Энергия такой системы представлена в виде аддитивной суммы независимых энергетических вкладов парных невалентных ($E_{нев.}$), электростатических ($E_{эл.}$) взаимодействий атомов, энергии образования водородной связи и торсионной энергии ($E_{тор.}$), обусловленной заторможенным вращением групп атомов вокруг ординарных связей основной и боковых цепей составляющих молекулу аминокислотных остатков (двугранные углы ω, φ, ψ и χ). Для расчетов энергии указанных типов взаимодействий атомов использованы потенциальные функции, параметры для которых взяты из работ [3-4]. Такие потенциальные функции описывают взаимодействия парных атомов независимо от их окружения и определяются химическими типами атомов и расстояниями между их центрами.

Поиск минимумов конформационной энергии молекулы, соответствующих ее устойчивым, физиологически активным состояниям, осуществлялся с помощью метода сопряженных градиентов по программе расчета конформаций биополимеров, приведенной в [5]. Для описания конформационного состояния молекулы используется система идентификаторов, включающая понятие форм и шейпов аминокислотных остатков. Символом X_{ij} обозначают формы основной цепи остатка (R, B, L, P), соответствующие различным значениям двугранных углов φ и ψ : R ($\varphi, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$), B ($\varphi = -180^\circ \div 0^\circ, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$), L ($\varphi, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$) и P ($\varphi = 0^\circ \div 180^\circ, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$), где $ij = 11, \dots, 12, \dots, 13, \dots, 21, \dots$ и т.д. отвечают положениям боковой цепи (χ_1, χ_2, \dots); индекс 1 соответствует значениям углов в интервале $0^\circ \div 120^\circ$, индекс 2 - $120^\circ \div -120^\circ$, а индекс 3 - $-120^\circ \div 0^\circ$. Свернутые и развернутые формы основной цепи описываются шейпами f и e , соответственно. Шейпы свернутого типа (f) образованы формами основной цепи R-R, R-B, B-L, L-L, B-P, L-P, P-R, P-B, а шейпы развернутого типа (e) B-B, B-R, R-L, L-B, R-P, P-L, P-P, L-P. Все конформации группируются по формам основной цепи, а формы - по шейпам. Число шейпов у фрагмента из n остатков равно 2^{n-1} , число форм в каждом шейпе определяется количеством комбинаций R, B, L и P форм.

На рис.1 приведена расчетная модель молекулы [Нур³]Мет-галлатостатина с обозначением всех переменных параметров и схема поэтапного расчета, включающая независимое исследование три- и пентапептидных фрагментов. Такой подход позволяет свести решение полной конформационной задачи к последовательному нахождению геометрических параметров, соответствующих низкоэнергетическим состояниям отдельных фрагментов исследуемой молекулы. Результаты каждого этапа исследований представляют самостоятельный интерес и, в конечном итоге, позволяют установить набор низкоэнергетических структур для всей молекулы.

Нулевые приближения для начальных конформационных состояний независимых фрагментов формировались из R, B форм основной цепи Pro и Нур B, R, L и P форм остатков Gly, Tyr, Asp, Phe и Met при различных конформационных положениях их боковых цепей, соответствующих низкоэнергетическим конформациям метиламидов-N-ацетил- α -аминокислот [6].

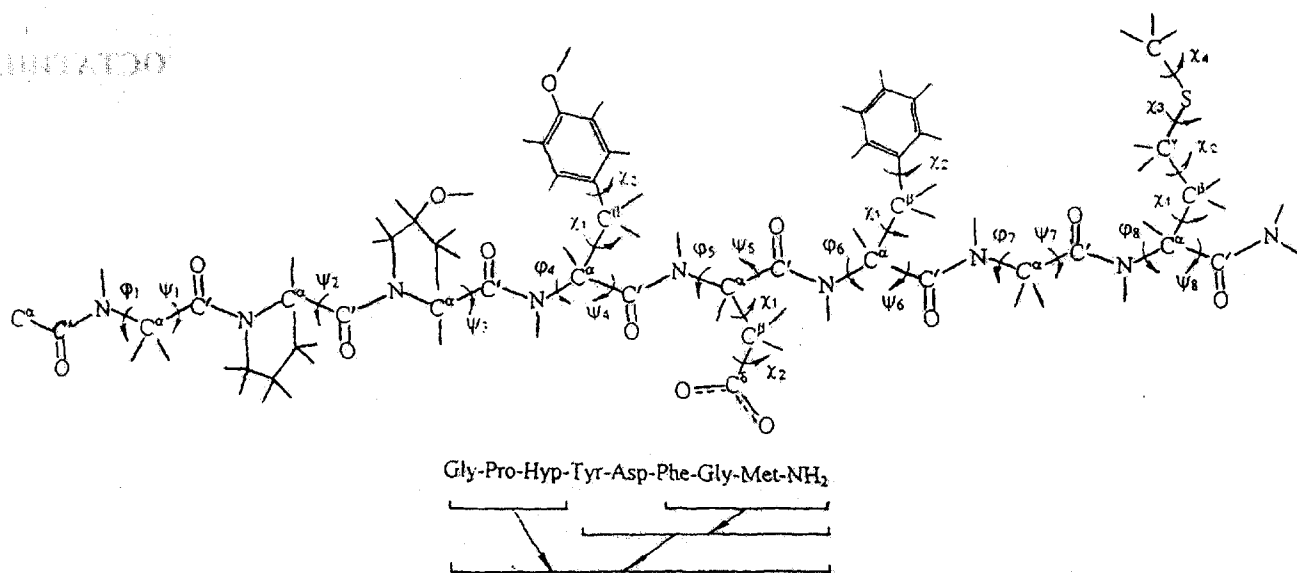


Рис. 1. Модель и схема расчета молекулы [Hyp³]Met-галлатостатина.

ТРИПЕПТИД PHE-GLY-MET-NH₂. Начальные приближения для данного фрагмента представлены 324 конформационными состояниями, принадлежащими 4 возможным шейпам и 36 формам пептидного остова. В табл.1 приведены энергетические характеристики более 200 конформаций, полученных после минимизации энергии при варьировании двугранных углов ω, φ, ψ и χ . В интервал с относительной энергией 0 ± 3 ккал/моль попадают $\sim 49\%$ рассчитанных структурных вариантов. Низкоэнергетические конформации фрагмента принадлежат, в основном, шейпам ef и fff , в которых R и B-формы основной цепи остатков Phe и Met распределены приблизительно одинаковым образом. Они стабилизированы энергетически выгодными контактами атомов боковых цепей Phe и Met при значениях углов вращения $\chi_1 = 60, 180$ и -117° и $\chi_2 \sim 90^\circ$ (Phe) и $\chi_1 \sim -60^\circ, \chi_2, \chi_3, \chi_4 \sim 180^\circ$ (Met). Наименьшую потенциальную энергию имеет конформация с B-R-B формой основной цепи, которая наиболее компактна вследствие взаимного расположения пептидного скелета и боковых цепей Phe и Met. Энергетическая дифференциация среди конформеров со свернутыми формами основной цепи (R-R-R, R-R-B), принадлежащими шейпу fff , меньше, чем у рассмотренных выше. Это обусловлено отсутствием существенных взаимодействий между боковыми цепями Phe и Met, что приводит к уменьшению дисперсионной и электростатической стабилизации \sim на 1,2 ккал/моль. Низкоэнергетические представители всех форм и шейпов исследуемого фрагмента с относительной энергией $0-3$ ккал/моль включены в последующую схему расчета.

ПЕНТАПЕПТИД TYR-ASP-PHE-GLY-MET-NH₂. Начальные приближения для данного фрагмента составлены из стабильных конформаций трипептида Phe-Gly-Met-NH₂ и монопептидов Tyr и Asp. Подвижность боковых цепей Tyr и Asp обеспечивается значениями углов $\chi_1 = 60, 180$ и 60° и $\chi_2 = 90^\circ$ (для Tyr) и $\chi_1 = 60, 180$ и -60° и $\chi_2 = 90^\circ$ (для Asp). Всего для минимизации полной конформационной энергии фрагмента составлен 441 структурный вариант,

принадлежащий 16 шейпам и 72 формам основной цепи. Конформационные особенности фрагмента обусловлены объемными боковыми цепями остатков Tyr, Phe и заряженной боковой цепью аспарагиновой кислоты. Поэтому наибольшее количество низкоэнергетических конформаций (16 конформаций) с относительной энергией $0-5$ ккал/моль характеризуется структурой свернутого типа (табл.1), обозначенного шейпом $ffff$. В целом шейпы пептидного остова $efff, ffff$ стабилизированы многочисленными дисперсионными взаимодействиями гидрофобных боковых цепей Tyr и Phe, водородными связями между атомными группами на сближенных N и C концевых остатках исследуемого участка молекулы. Полностью свернутые структуры \sim на 3 ккал/моль уступают самой низкоэнергетической конформации фрагмента, принадлежащей шейпу $ffee$. Наибольший вклад в общую потенциальную энергию фрагмента вносят невалентные взаимодействия основной цепи Asp и боковой цепи Tyr ($-3,45$ ккал/моль), а также дисперсионные взаимодействия ароматических колец Met и Phe ($-2,84$ ккал/моль). Характерной особенностью такой структуры является водородная связь, образованная между карбонильным кислородом Tyr и амидным водородом Met, вклад от энергии образования которой составил $-1,4$ ккал/моль. Конформации с L формами основной цепи Tyr и Asp относятся к более высокоэнергетичным и остаются за пределами выбранного энергетического интервала. Полувернутые формы основной цепи, представленные шейпом $eeff$, характеризуются 8 конформационными состояниями с относительной энергией $0-5$ ккал/моль. Отличительная особенность структур этого типа - выгодные дисперсионные взаимодействия аминокислотных остатков Tyr и Phe, обусловленные параллельным расположением их ароматических колец, расстояние между C атомами которых составляет $\sim 2,6$ Å. Именно такое расположение обеспечивает максимальный вклад от энергии их дисперсионных взаимодействий, равный $-4,67$ ккал/моль. Полностью вытянутые структу-

ры фрагмента, принадлежащие шейпу eeee, также как и представители других шейпов энергетически менее предпочтительны. Однако выводы о роли этих структур в формировании пространственной организации молекулы [Нур³]Мет-галлатостатина можно сделать на основе кон-

формационного анализа всей молекулы. Поэтому низкоэнергетические представители всех рассмотренных форм и шейпов основной цепи будут включены в дальнейшие расчеты.

Таблица 1. Низкоэнергетические конформации фрагментов молекулы [Нур³]Мет-галлатостатина.

Фрагмент	Конформация	Шейп	Энергетические вклады, ккал/моль				
			<i>E_{нев.}</i>	<i>E_{эл.}</i>	<i>E_{тор.}</i>	<i>E_{пол.}</i>	<i>E_{огн.}</i>
Phe-Gly-Met- NH ₂	B ₂ RB ₃	ef	-9.08	1.67	1.13	-6.27	0
	R ₂ PR ₃		-9.22	1.69	1.50	-6.02	0.25
	R ₃ PB ₃		-7.74	1.61	0.97	-5.16	1.11
	B ₃ RR ₃		-7.86	1.92	1.27	-4.68	1.59
	R ₂ LL ₂		-7.63	2.05	1.59	-3.99	2.28
	L ₂ RB ₁		-8.07	2.01	2.18	-3.88	2.39
	B ₃ PR ₃	ff	-8.33	1.50	1.22	-5.62	0.65
	B ₃ PB ₃		-8.48	1.41	1.55	-5.53	0.74
	R ₂ RB ₃		-8.16	1.81	1.09	-5.26	1.01
	R ₃ RR ₂		-8.36	1.95	1.30	-5.11	1.16
	L ₃ PB ₂		-7.70	1.53	1.61	-4.54	1.73
	L ₃ PR ₃		-7.22	1.45	1.28	-4.50	1.77
	R ₂ BL ₃		-7.30	1.65	1.45	-4.19	2.08
	B ₂ LL ₂	-7.31	1.55	2.30	-3.45	2.82	
	R ₃ LB ₁	ee	-9.01	1.97	1.26	-5.78	0.49
	B ₃ BB ₃		-8.02	1.58	1.40	-5.04	1.23
	L ₃ BB ₁		-8.49	1.67	1.80	-5.02	1.25
	B ₃ BB ₁		-7.73	1.55	1.62	-4.56	1.71
	L ₃ BR ₃		-7.78	1.74	1.60	-4.45	1.82
	R ₃ LR ₁		-6.77	2.20	1.22	-3.35	2.92
	B ₂ LB ₂	fe	-8.74	1.57	1.81	-5.36	0.91
	R ₂ BB ₂		-8.01	1.64	1.06	-5.31	0.96
	R ₂ BR ₂		-7.66	1.63	0.89	-5.14	1.13
	B ₂ LR ₂		-8.35	1.66	1.56	-5.13	1.14
L ₃ LB ₂	-6.78		1.88	1.50	-3.41	2.86	
Tyr-AspPhe-Gly-Met-NH ₂	R ₁ R ₁ R ₃ LB ₁	ffee	-25.75	2.46	2.73	-20.55	0.00
	R ₁ R ₁ B ₃ BR ₃		-22.83	2.57	2.29	-17.98	2.57
	B ₂ B ₂ B ₃ PR ₃	eeff	-23.22	2.76	1.90	-18.57	1.98
	R ₁ R ₁ R ₃ RR ₂	ffff	-22.74	2.25	1.99	-18.50	2.05
	R ₁ R ₁ B ₃ PR ₃		-22.42	2.01	1.96	-18.46	2.09
	B ₃ R ₁ B ₃ BR ₃	efee	-23.23	2.73	2.93	-17.57	2.98
B ₃ R ₂ B ₃ PR ₃	efff	-20.75	2.80	1.25	-16.70	3.85	
Gly-Pro-Hyp	PBB	fe	-3.20	-1.33	0.35	-4.19	0.00
	PBR		-2.85	-1.33	0.20	-3.98	0.21
	RBR		-2.81	-1.03	0.60	-3.24	0.95
	RBB		-3.25	-0.98	0.81	-3.41	0.78
	LBR	ee	-3.26	-0.95	0.73	-3.48	0.71
	LBB		-2.47	-0.99	0.54	-2.91	1.27
	BBR		-0.27	-1.27	0.37	-1.17	3.02
	BBB		-0.13	-1.25	0.35	-1.03	3.16

ТРИПЕПТИД GLY-PRO-HYP. Конформационные возможности данного фрагмента ограничены наличием остатков пролина и оксипролина, представленными двумя формами основной цепи (R и B). У концевого остатка Gly R и L формы эквивалентны B и P формам соответственно, поэтому исходный набор структурных вариантов фрагмента включал 12 конформаций, принадлежащих 4 шейпам и 12 формам основной цепи. Выбранные после минимизации энергии низкоэнергетические конформации фрагмента приведены в табл. 1.

Как следует из результатов расчета вероятность реализации конформаций с B-B-R и B-B-B формами основной цепи крайне мала, поэтому они не могут участвовать в формировании физиологически активных конформаци-

онных состояний всей молекулы. Специфика аминокислотной последовательности фрагмента оказывает неблагоприятное воздействие на реализацию структур с R формами Pro. Количество низкоэнергетических конформаций, выбранных для анализа пространственной структуры [Нур³]Мет-галлатостатина составило 8.

[Нур³]МЕТ-ГАЛЛАТОСТАТИН. Анализ пространственного строения и конформационных возможностей природной молекулы [Нур³]Мет-галлатостатина был проведен на основе перекрывающихся участков молекулы согласно схеме расчета на рис. 1. В табл.2 приведены низкоэнергетические конформации 60 рассчитанных форм и 40 шейпов молекулы [Нур³]Мет-галлатостатина.

Таблица 2. Низкоэнергетические конформации молекулы [Нур³]Met-галлатостатина.

Шейп	Конформация	Энергетические вклады, ккал/моль				
		$E_{нев.}$	$E_{эл.}$	$E_{тор.}$	$E_{пол.}$	$E_{отн.}$
<i>feffff</i>	PBRR ₁ R ₁ R ₃ RR ₂	-32.92	3.61	2.58	-26.73	0.0
	RBRR ₁ R ₁ R ₃ RR ₂	-33.14	3.94	2.99	-26.21	0.52
	PBRR ₁ R ₁ B ₃ PR ₃	-32.88	3.48	3.30	-26.10	0.63
	RBRR ₁ R ₁ B ₃ PR ₃	-33.13	3.81	3.74	-25.57	1.16
<i>eeffff</i>	LBRR ₁ R ₁ R ₃ RR ₂	-32.45	3.92	2.83	-25.69	1.04
	LBRR ₁ R ₁ B ₃ PR ₃	-33.04	3.73	3.64	-25.68	1.05
	BBRR ₁ R ₁ R ₃ RR ₂	-29.95	3.71	2.55	-23.68	3.05
<i>fefffee</i>	RBRR ₁ R ₁ B ₃ BR ₃	-32.34	4.18	3.13	-25.02	1.07
	PBRR ₁ R ₁ B ₃ BR ₃	-31.71	3.86	2.69	-25.16	1.57
	PBRR ₃ R ₁ R ₃ LB ₁	-30.50	4.22	2.72	-23.56	3.17
<i>eefffee</i>	LBRR ₁ R ₁ B ₃ BR ₃	-31.84	4.17	3.07	-24.60	2.13
	LBRR ₃ R ₁ R ₃ LB ₁	-31.00	4.53	3.13	-23.34	3.39
	BBRR ₁ R ₁ B ₃ BR ₃	-29.28	3.95	2.73	-22.59	4.14
<i>feffeee</i>	RBRR ₁ R ₁ L ₃ BB ₁	-33.30	4.35	3.57	-25.38	1.35
	PBRR ₁ R ₂ L ₃ BB ₁	-30.49	4.32	2.52	-23.65	3.08
<i>fefffef</i>	RBRR ₁ R ₁ R ₃ PB ₃	-30.98	4.33	3.49	-23.16	3.57
	PBRR ₁ R ₁ R ₃ PB ₃	-30.81	3.99	3.01	-23.80	2.93
<i>feefffe</i>	RBRR ₁ R ₁ R ₂ BB ₂	-31.41	5.29	3.21	-22.90	3.83

Глобальная структура молекулы, представленная шейпом *feff₅*, характеризуется компактной свернутой формой основной цепи со сближенными боковыми цепями остатков Туг, Asp и Phe. В этой структуре конформационные состояния три- и пентапептидных фрагментов отвечают низкоэнергетическим конформациям свободных участков (табл. 1 и 2). Реализация целого ряда дополнительных взаимодействий не нарушает благоприятных контактов атомов на локальных участках молекулы. К таким дополнительным взаимодействиям относятся электростатические и невалентные взаимодействия атомов основной и боковых цепей остатков Туг с Asp (-3,3 ккал/моль), Met (-1,7 ккал/моль) и Phe (-1,8 ккал/моль), суммарный вклад энергии от которых составляет ~ -10 ккал/моль. Центром электростатической стабилизации является боковая цепь Asp, которая участвует в формировании эффективных взаимодействий с основной цепью Туг. В целом шейп *feff₅* представлен 3 формами основной цепи, лучшие конформационные состояния которых не существенно отличаются по энергии. Форма PBRR₁R₁R₃RR₂ имеет наибольшее число низкоэнергетических конформаций, отличающихся лишь различными ориентациями боковых цепей. К структурам свернутого типа относятся также низкоэнергетические конформации шейпов *feef₄*, *e₃f₄*, *f₃ef*, *e₂f₅* (табл.2). Однако лучшая из них LBRR₁R₁R₃RR₂ уступает глобальной структуре молекулы не только по энергии (~ 1,04 ккал/моль), но и по конформационной подвижности боковой цепи Met. Взаимодействия групп атомов боковой цепи Met с боковой цепью Asp и Туг вносят стабилизирующий вклад, равный -1,4 и -1,6 ккал/моль. Среди низкоэнергетических структур этих шейпов имеются конформации, в которых заряженная боковая цепь Asp ориентирована в сторону растворителя и не участвует в контактах с пептидным остовом молекулы. Конформации шейпов *feff₃e₂* и *e₂f₃e₂* имеют полусвернутые формы основной цепи. Энергия таких структур определяется главным образом эффективными стабили-

зирующими контактами боковых цепей Phe и Met с элементами основной цепи Нур (-2,3 и -1,7 ккал/моль) соответственно. Четко детерминированные взаимные положения остатков Phe и Met могут быть нарушены за счет изменения состояний боковых цепей Туг и Asp и сопровождаться резким увеличением конформационной энергии молекулы.

Энергия всех конформаций остальных шейпов превышает 5 ккал/моль, вероятность их реализации крайне мала и поэтому они не могут быть отнесены к физиологически активным конформационным состояниям природной молекулы. Структуры этих типов уступают рассмотренным выше, как по электростатическим, так и по дисперсионным взаимодействиям, поскольку такая форма цепи неблагоприятно сказывается одновременно и на расположении зарядов, и на реализации стабилизирующих контактов гидрофобных групп удаленных друг от друга остатков на противоположных концах молекулы.

Обобщая результаты проведенных исследований, можно высказать следующее предположение относительно пространственной организации молекулы [Нур³]Met-галлатостатина. Являясь функционально активным участком молекул галлатостатинов, [Нур³]Met-галлатостатин характеризуется набором низкоэнергетических конформационных состояний со свернутой структурой пентапептидного фрагмента Туг-Asp-Phe-Gly-Met-NH₂, концевые группы которого сближены на расстояние ~1.9 Å. Основной вклад в стабилизацию самой низкоэнергетической структуры молекулы (табл.2), отвечающей биологически активной конформации природного [Нур³]Met-галлатостатина, вносят невалентные взаимодействия боковых цепей аминокислотных остатков Туг, Phe и Met, а центром электростатической стабилизации структуры молекулы является заряженная боковая цепь аспарагиновой кислоты, участвующая в формировании водородных связей с основной цепью пептидного остова молекулы.

[1] H. Duve, A.H. Johnsen, A. Thorpe et al. J. Biol.Chem., 1994, v. 269, № 33, p. 21059-21066.

[2] H. Duve, A.H. Johnsen, A. Thorpe et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1993, v. 90, p.2456-2460.

- [3] IUPAC-IUB Commision on Biochem.Nomenclature. Biochem.Biophys.Acta, 1971, v. 229, p. 1.
- [4] *F.A. Motany, Mc R.F. Guire, A.W. Burgess, H.A. Scheraga.* J.Phys.Chem., 1975, v. 79, № 7, p. 2361-2381.
- [5] *И.С. Максумов, Л.И. Исмайлова, Н.М. Годжаев.* Ж. Структ. химии., 1983, т. 24, № 4, с. 147-148.
- [6] *Е.М. Попов.* Структурная организация белков. М. Наука, 1989, с. 352.

L.İ. Vəliyeva, İ.N. Əliyeva, C.İ. Əliyev, N.M. Qocayev

[HYP³]MET-QALLATOSTATİN MOLEKULUNUN FƏZA TƏŞKİLİ

Nəzəri konformasiya analizi üsulu ilə müxtəlif həşəratlardan alınmış [Hyp³]Met-qallatostatin molekulunun fəza quruluşu öyrənilmişdir. Molekulu təşkil edən aminturşuları qalıqlarının kənar zəncirlərinin konformasiya imkanları nəzərdən keçirilmiş və göstərilmişdir ki, molekulun kiçik enerjili konformasiya halları onun N-sonluqlu pentapeptid fraqmentinin bükülmüş forması ilə xarakterizə olunur.

L.I. Velieva, I.N. Alieva, D.I. Aliev, N.M. Godjaev

SPATIAL STRUCTURE OF THE [HYP³]MET-CALLATOSTATIN MOLECULE

The spatial structure of the [Hyp³]Met-callatostatine molecule isolated from different kind insects has been investigated by the theoretical conformational analysis method. The conformational flexibility of the amino acid side chains formed the neuropeptide molecule structure has been studied. It is shown that the low energetical conformational states of the molecule are represented by the folded forms of the N-terminal pentapeptide fragment.