

РОЛЬ ЗАРЯЖЕННЫХ ОСТАТКОВ В ПРОСТРАНСТВЕННОМ СТРОЕНИИ ПЕНТАПЕПТИДА ИММУНОГЛОБУЛИНА E ЧЕЛОВЕКА.

Г.А. АГАЕВА

Бакинский Государственный Университет им.М.Э. Расулзаде,
370145, г.Баку, ул.З.Халилова, 23.

Методом теоретического конформационного анализа исследовано пространственное строение пентапептида Asp-Ser-Asp-Pro-Arg, включающего активный центр иммуноглобулина E человека, и четырех его структурных аналогов [Asn¹], [Asn³], [Arg⁵] и [Asp¹,Asp³,Arg⁵]. Было показано, что этот пентапептид в физиологических условиях способен формировать две похожие изоэнергетичные квазициклические структуры. Конформационный анализ аналогов пентапептида иммуноглобулина E определил, что для образования стабильной квазициклической структуры природной молекулы необходимо наличие всех заряженных остатков.

Иммуноглобулины E (IgE) являются основным классом иммуноглобулинов, отвечающих за аллергические реакции. Поэтому большой научный интерес представляют синтетические пептидные препараты, способные блокировать функциональные возможности IgE. Определение функциональных и конформационных свойств таких пептидных соединений может способствовать созданию на их основе более эффективных лекарственных препаратов как терапевтическое средство против аллергии.

В работе [1] был синтезирован пентапептид Asp-Ser-Asp-Pro-Arg, включающий активный центр IgE. Результаты биологического тестирования в виде усредненного процента ингибирования реакции гиперчувствительности показали, что этот пентапептид в свободном состоянии способен взаимодействовать с комплиментом тучных клеток и предотвращает связывание IgE с этими клетками [1,2]. Было показано, что этот пентапептид не только может ингибировать или предотвращать связывание IgE с тучными клетками, но также может смещать уже связанный IgE с тучной клетки. Предполагается, что своеобразии аминокислотной последовательности этого пентапептида обеспечивает формирование пространственного строения комплементарного рецептору, находящемуся на тучной клетке. Целью настоящего исследования было определение конформационных особенностей пентапептида IgE человека, возможно необходимых для проявления его ингибиторной активности. Данное конформационное исследование пентапептида IgE предполагало также определение роли каждого из составляющих его заряженных аминокислотных остатков в укладке стабильной структуры этой молекулы. Для этой цели были рассмотрены конформационные особенности четырех структурных аналогов пентапептида IgE [Asn¹], [Asn³], [Arg⁵] и [Asn¹,Asn³,Arg⁵], в которых заряженные аминокислотные остатки были замещены на похожие, но нейтральные остатки.

МЕТОД РАСЧЕТА

Исследование пространственного строения пентапептида IgE проводилось методом теоретического конформационного анализа с использованием стандартной геометрии. При конформационном расчете пептидов учитывались невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионные потенциалы. Невалентные взаимодействия оценивали по потенциалу

Леннарда-Джонса с параметрами Скотта и Шераги [3]. Электростатическую энергию рассчитывали в монополярном приближении по закону Кулона с использованием зарядов, предложенных в работе [4]. Параметризация потенциальных функций была аппроксимирована к условиям полярной среды: величина диэлектрической проницаемости принята равной 10 [5], а водородные связи, оцениваемые по потенциалу Морзе [5], предполагались ослабленными (максимальная энергия при $r_0 = 1,8 \text{ \AA}$ составляла -6.2 кдж/моль). Торсионные потенциалы и величины барьеров взяты такими как в работе [5].

При обсуждении результатов расчета были использованы понятия "форма" и "шейп" пептидной цепи [6]. Под формой основной цепи молекулы подразумевается последовательность форм остатков, определяемых низкоэнергетическими областями R, B, L и P на конформационной карте по двугранным углам основной цепи φ - ψ . Разнообразные формы, в свою очередь, распределены по шейпам пептидного остова, определяющим направленность хода основной цепи. В случае фрагмента из двух аминокислотных остатков все формы основной цепи могут быть сгруппированы в два класса – шейпы e и f. Символом e обозначаются формы с развернутой основной цепью (BB, BR, RL, PR, LR, PL, LB и PP), а f – со свернутой (RR, RB, BL, BP, PB, LL и LP). В качестве начальных приближений при расчете конформаций отдельных молекул послужили известные значения двугранных углов основной φ , ψ и боковых цепей χ ($60^\circ=1, 180^\circ=2, -60^\circ=3$), соответствующих низкоэнергетическим состояниям монопептидов. Отсчет двугранных углов проводился согласно общепринятой номенклатуре [7]. В расчетах были использованы программа и техника расчета, разработанные и использованные авторами в работах [8,9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Поиск наиболее стабильных конформаций пентапептида Asp-Ser-Asp-Pro-Arg осуществлялся на основе фрагментарного анализа путем перебора всех комбинаций локальных минимумов, образующих фрагменты остатков. Присутствие остатка пролина (Pro) в последовательности пептида значительно ограничивает его конформационные возможности. В отличие от других остатков пролин (Pro), благодаря жестко фиксированной связи N-C α , не может реализовать L-состояние. Кроме того, для

остатка предшествующего пролину, стерически разрешена лишь В форма основной цепи [10].

Сначала были рассчитаны стабильные конформации С-концевого трипептида: Asp-Pro-Arg. Из четырех возможных шейпов для трипептида, в данной последовательности возможны только два: *ee* и *ef*. Поскольку у пролина нет бокового радикала, практически, варьировались положения боковых цепей аспарагиновой кислоты (Asp) и аргинина (Arg). Оба этих остатка имеют заряженные функциональные группы на концах своих боковых цепей. У аспарагиновой кислоты это отрицательно заряженная карбоксильная группа, а у остатка аргинина – положительно заряженная гуанидиновая группа.

Результаты расчетов показали, что низкоэнергетические конформации шейпа *ee* более чем на 2 ккал/моль стабильнее лучших конформаций шейпа *ef*. В низкоэнергетических конформациях шейпа *ee* реализуется наиболее эффективное трипептидное взаимодействие между остатками Asp и Arg. В этих конформациях образуется водородная связь между атомом кислорода карбоксильной группы Asp и атомом водорода H^δ гуанидиновой группы Arg. Благодаря водородной связи в низкоэнергетических конформациях трипептида формируется квазициклическая структура. В качестве исходных приближений для следующего фрагмента Ser-Asp-Pro-Arg использовались стабильные конформации трипептида и монопептида серина (Ser). Расчет конформаций тетрапептида показал, что для этого пептида энергетически предпочтительными оказались структуры, включающие глобальную полностью развернутую конформацию трипептида: *fee*.

Расчет стабильных конформаций пентапептида проводился на основе низкоэнергетических структур тетрапептида и монопептида Asp. Энергетически предпочтительными и изоэнергетичными для пентапептида оказались две конформации с похожими формами основной

цепи: *BRBBB* и *RRBBB*. Фрагментарный конформационный анализ показал, что в пентапептиде сохраняется преемственность глобальных конформаций предыдущих пептидов, т.е. самая низкоэнергетическая конформация трипептида реализуется в глобальной конформации тетрапептида, в свою очередь, глобальная конформация тетрапептида сохраняется в двух глобальных конформациях пентапептида. В таблице 1 приведены энергетические вклады всех межостаточных взаимодействий, реализуемые в оптимальных конформациях восьми шейпов пентапептида. В глобальной конформации *B₂R₁B₁BB₃₂* наряду с эффективным взаимодействием между остатками Asp³ и Arg⁵, реализуется эффективное пентапептидное взаимодействие между остатками Asp¹ и Arg⁵. В отдельных конформациях двух глобальных форм пентапептида в результате эффективного пентапептидного взаимодействия образуется еще одна водородная связь между атомами карбоксильной группы Asp¹ и атомами гуанидиновой группы Arg⁵. Наличие остатка Pro в позиции 4 последовательности пентапептида способствует формированию различных β-изгибов. В двух глобальных конформациях расстояние между атомами C^α первого и четвертого остатков оказалось меньше 7Å, что характерно для пространственного строения, соответствующего β-изгибу. Формирование β-изгиба в двух похожих низкоэнергетических конформациях пентапептида и образование в них водородных связей типа 1-3 и 1-5 свидетельствует о том, что этот пептид может реализоваться в компактную квазициклическую структуру, которая может рассматриваться как вероятная “ингибирующая” конформация, т.е. необходимая для связывания пептида с рецептором на тучной клетке. В таблице 2 приведены величины двугранных углов двух глобальных конформаций пентапептида.

Таблица 1.

Энергетические вклады межостаточных взаимодействий в стабильных конформациях пентапептида

Конформация	Энергетические вклады межостаточных взаимодействий в стабильных конформациях пентапептида Asp ¹ -Ser ² -Asp ³ -Pro ⁴ -Arg ⁵ , (кдж/моль)									
	Asp ¹ Ser ²	Ser ² Asp ³	Asp ³ Pro ⁴	Pro ⁴ Arg ⁵	Asp ¹ Asp ³	Ser ² Pro ⁴	Asp ³ Arg ⁵	Asp ¹ Pro ⁴	Ser ¹ Arg ⁵	Asp ¹ Arg ⁵
<i>B₂R₁B₁BB₃₂</i>	4.6	-5.4	-14.2	-6.9	-5.0	-2.1	-40.2	-1.2	-2.1	-28.5
<i>R₁R₁B₁BB₃₂</i>	-6.3	-7.1	-13.0	-6.3	-10.3	-1.7	-39.0	-0.8	-4.2	-21.8
<i>B₂L₁B₁BB₃₂</i>	0.8	1.7	-14.2	-6.9	-10.0	-1.7	-30.6	-0.4	-1.2	1.2
<i>B₂B₃B₁BB₁₂</i>	-9.2	-2.1	-14.2	-6.3	-10.5	-1.7	-28.9	0.0	-1.7	-1.2
<i>R₁R₁B₁RR₃₂</i>	-6.3	-4.2	-13.4	-10.3	-12.6	-2.5	2.0	-1.2	-0.4	-2.9
<i>R₁B₁B₁RR₁₂</i>	-5.4	-4.2	-14.2	-10.5	-13.4	-1.3	-2.5	0.0	-0.4	1.2
<i>B₁R₁B₁RR₁₂</i>	-7.9	-7.9	-14.2	-10.5	-5.0	-1.7	0.0	-3.7	-0.4	0.0
<i>B₁B₃B₁RR₁₂</i>	-8.4	-2.5	-14.7	-12.2	-7.1	-2.1	0.0	-0.4	-0.4	0.8

Таблица 2.

Величины двугранных углов (град) двух глобальных конформаций пентапептида *IgE*.

Остаток/Конформация	<i>B₂R₁B₁BB₃₂</i>	<i>R₁R₁B₁BB₃₂</i>
Asp	-96, 152, 172, 182, 86	-155, -46, 171, 58, 111
Ser	-32, -61, 183, 55, 179	-74, -63, 176, 55, 179
Asp	-110, 151, 174, 56, 95	-118, 146, 176, 56, 97
Pro	125, 176	122, 168
Arg	-132, 103, -58, 178, 183, 179	-127, 103, -60, 178, 183, 180
Е _{отн} (кдж/моль)	0,0	0,0

Примечание: Величины двугранных углов даны в последовательности - φ, ψ, ω, χ₁, χ₂, χ₃, χ₄.

Как показал конформационный анализ пентапептида *IgE* в формировании стабильных квазициклических структур этой молекулы основополагающую роль играют противоположно заряженные остатки. Именно благодаря специфическим взаимодействиям между этими остатками происходит стабилизация и квазициклизация в конформациях пентапептида. Для исследования влияния каждого из заряженных остатков пентапептида на его конформационные возможности был проведен расчет стабильных конформаций исходной молекулы с аминокислотными заменами в ее последовательности. Представленные в данной работе структурные аналоги предлагались, главным образом, исходя из своеобразия аминокислотной последовательности пентапептида. Отрицательно заряженные остатки аспарагиновых кислот в позициях 1 и 3 заменялись на структурно похожие, но нейтральные остатки аспарагина, а положительно заряженный аргинин в позиции 5 на нейтральный остаток метионина, обладаю-

щий также длинной линейной боковой цепью. Эти модификации не касаются основной цепи молекулы, а сосредоточены только на боковых радикалах остатков. Предлагаемые замены позволяют определить и оценить вклад каждого из заряженных остатков в стабилизацию молекулы в целом. В конформационном анализе структурных аналогов пентапептида *IgE* в качестве начальных приближений использовались наиболее оптимальные конформации всех восьми шейпов пентапептида.

Для оценки влияния первого отрицательно заряженного остатка Asp¹ были проанализированы конформационные особенности структурного аналога [Asn¹]. Эта замена в целом заметно снижает стабильность всех низкоэнергетических конформаций исходного пентапептида. На 6 ккал/моль занижен вклад электростатических взаимодействий в отдельных конформациях. Однако энергетически предпочтительными остались самые стабильные формы исходного пентапептида (таблица 3).

Таблица 3.

Относительная энергия стабильных конформаций пентапептида *IgE* и его аналогов.

	Шейп	Конформация	Величина относительной энергии стабильных конформаций исходной молекулы и его аналогов (кдж/моль).				
			Молекула	[Asn ¹]	[Asn ³]	[Met ⁵]	[Asn ¹ ,Asn ³ ,Met ⁵]
1.	<i>efee</i>	$B_2R_1B_1BB_{32}$	0.0	0.0	2.5	16.3	0.0
2.	<i>ffee</i>	$R_1R_1B_1BB_{32}$	0.0	7.7	13.7	13.0	23.9
3.	<i>feee</i>	$B_2L_1B_1BB_{32}$	23.0	16.7	16.3	15.9	28.0
4.	<i>eeee</i>	$B_2B_3B_1BB_{12}$	23.9	20.1	16.7	29.9	15.0
5.	<i>ffef</i>	$R_1R_1B_1RR_{32}$	24.7	7.5	7.5	0.0	4.6
6.	<i>feef</i>	$R_1B_1B_1RR_{12}$	37.3	14.7	13.7	13.7	15.5
7.	<i>efef</i>	$B_1R_1B_1RR_{12}$	39.4	20.9	0.0	18.8	0.8
8.	<i>eeef</i>	$B_1B_3B_1RR_{12}$	46.5	10.9	2.9	23.4	7.7

Во втором аналоге [Asn³] исследуется роль отрицательно заряженного остатка в позиции 3. Расчет для этого аналога показал что, оптимальные конформации всех восьми шейпов одинаково стабилизируются и величины их относительной энергии входят уже в интервал 0-4ккал/моль. В связи с этой заменой энергетически равновероятными становятся конформации четырех шейпов: *efee, eeef, efef* и *ffef*. Как видно из таблицы 3 при замене Asp³ на Asn изменяется шкала предпочтительности стабильных конформаций по относительной энергии. Таким образом можно сделать вывод, что остаток Asp³ в пентапептиде *IgE* играет особую формообразующую роль в низкоэнергетических конформациях. Замена остатка Arg⁵ на Met в структурном аналоге [Met] значительно снижает энергетический вклад электростатических взаимодействий и невалентных взаимодействий.

Таким образом можно сделать вывод, что остаток Asp³ в пентапептиде *IgE* играет особую формообразующую роль в низкоэнергетических конформациях. Замена остатка Arg⁵ на Met в структурном аналоге [Met] значительно снижает энергетический вклад электростатических взаимодействий и невалентных взаимодействий. По всей видимости остаток Met не восполняет тот энергетический вклад, реализуемый боковой цепью остатка Arg в исходном пентапептиде. Здесь, как и в случае аналога [Asn³], происходит перераспределение стабиль-

ных конформаций по шкале относительной энергии, что свидетельствует о важной формообразующей роли остатка Arg в последовательности пентапептида.

Следующий аналог [Asn¹,Asn³,Met⁵] является комбинированием предыдущих замен. Как показал расчет, энергетические вклады электростатических взаимодействий в конформациях этого аналога совершенно незначительны. Конформации этого аналога стабилизируются только благодаря невалентным взаимодействиям. Комбинирование всех точечных замен в одном аналоге привело к еще большей дестабилизации и перераспределению низкоэнергетических конформаций исходного пентапептида.

В результате проведенных расчетов можно прийти к заключению, что все вышеперечисленные замены не эффективны в конформационном аспекте, но это исследование позволило выявить конформационную необходимость того или иного заряженного остатка в последовательности пентапептида. Для этих структурных аналогов более предпочтительными становятся неупорядоченные компактные конформации, а не квазициклические структуры, реализующиеся благодаря наличию заряженных остатков в природной последовательности пентапептида *IgE*.

- [1] *R.N. Hamburger*. Science, 1975, V.189,P.389-391. [7] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature// Biochim. Biophys.Acta, 1971,V.121, P.121.
- [2] *G.S. Hahn*. Nature, 1986, V.324,P.283-285. [8] *Н.М. Годжаев, И.С. Максумов, Л.И. Исмаилова*. Ж.Структ.хим.,1983, Т.24.,с.147.
- [3] *R.A. Scott., H.A Scheraga*. J.Chem.Phys., 1966, V.45, P.2091-2098. [9] *Г.А Агаева, И.Б. Болотина, В.О.Чехов*. Биофизика, 1989,Т.XXXIV, вып.1, С.14.
- [4] *F.A Momany, McGuire, A.W. Burgess, H.A. Scheraga*. J.Phys.Chem., 1975, V.79, P.2361-2368. [10] *P.R.Schimmel*. P.Flory // J.Mol.Biol.,1968, v.226,p.542-543.
- [5] *Г.М. Липкинд, С.Ф. Архипова, Е.М. Попов*. Молек. биол., 1970, Т.4, С.331-336.
- [6] *Е.М. Попов* Int. J.Quant. Chem., 1979, V.16, P.707-720.

G.A. Ağayeva

İNSANIN E İMMUNOQLOBULİNİN PENTAPEPTİDİNİN FƏZA QURULUŞUNDA YÜKLÜ QALIQLARIN ROLU

İnsanın E immunoqlobulinin pentapeptidin və onun dörd analoqlarının [Asn¹], [Asn³],[Arg⁵] və [Asn¹,Asn³,Arg⁵] fəza quruluşları nəzəri konformasiya üsulu ilə tədqiq olunmuşdur. Göstərilmişdir ki, bu pentapeptid yalnız iki oxşar kvazitsiklik konformasiya əmələ gətirir. Analoqların konformasiya analizi isə müəyyən etdi ki stabil kvazitsikl quruluşunun formalaşması üçün yüklü qalıqların rolu vacibdir.

G.A. Agayeva

THE ROLE OF CHARGED RESIDUES IN THE SPATIAL STRUCTURE OF THE HUMAN IMMUNOGLOBULIN E PENTAPEPTIDE

The spatial structure of the human immunoglobulin E pentapeptide Asp-Ser-Asp-Pro-Arg and four of its analogs [Asn¹], [Asn³],[Arg⁵] and [Asn¹,Asn³,Arg⁵] have been investigated by theoretical conformational analysis method. It is shown that this pentapeptide form only two very similar quasicyclic conformations. Conformational analysis of these IgE pentapeptide analogues determined that for formation of the native stable quasicyclic structure all charged residues are important.