

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ LEU-ГАЛЛАТОСТАТИНА 4

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

Бакинский Государственный Университет

370148, Баку, ул. З.Халилова, 23

Методом теоретического конформационного анализа изучено пространственное строение молекулы Leu-галлатостатина. Показано, что стабильная конформация нейропептида близка по геометрическим параметрам пептидного остова к α -спиральной структуре.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение пространственного строения и конформационной подвижности биологически активных нейропептидов семейства галлатостатинов необходимо для понимания молекулярных механизмов функционирования соединений, ингибирующих синтез и выделение ювенильных гормонов, ответственных за рост и метаморфоз насекомых [1-4]. К их числу относится нейропептид Leu-галлатостатин 4, выделенный из грудного ганглия мухи "Calliphora Vomitoria", C-концевая аминокислотная последовательность которого гомологична аллатостатинам, идентифицированным в других насекомых [5-6].

Метод расчета. Методом теоретического конформационного анализа изучены конформационные возможности нейропептида Leu-галлатостатина 4 и установлена пространственная организация молекулы, соответствующая минимальному значению ее внутримолекулярной энергии. Последняя представлена в виде аддитивной суммы вкладов энергии невалентных, электростатических взаимодействий составляющих молекулу атомов, энергии образования водородной связи и торсионной энергии, обусловленной заторможенным вращением атомов вокруг соединяющей их одинарной связи. Параметры полуэмпирических потенциальных функций, описывающих различные виды межатомных взаимодействий, взяты из [7,8]. Используемый методологический подход включает в себя разбиение молекулы на отдельные фрагменты и поиск их устойчивых конформационных состояний, соответствующих минимальному значению энергии межатомных взаимодействий в пределах каждого из исследуемых фрагментов [8]. Процедура минимизации энергии проведена методом сопряженных градиентов, позволяющим на каждом его этапе отбирать "перспективные" для дальнейшего расчета конформации. Критерий отбора основан на условии, согласно которому значение минимальной энергии заданной конформации (E) не должно превышать значение энергии ближних взаимодействий всех возможных конформеров (E_{min}) в пределах выбранного участка молекулы на величину ΔE , т.е. $E - E_{min} \leq \Delta E$. Величина ΔE выбрана путем анализа энергии ди- три- и других пептидных типов межостаточных взаимодействий в олигопептидах и белках [7,8]. В вычислительных экспериментах использована стандартная система идентификаторов, позволяющая описывать конформационные состояния молекулы, соответствующие различным значениям двугранных углов с помощью символов R, B, L, P характеризующих формы валентной цепи и шейпов e, f, характеризующих способ укладки

пептидной цепи в пространстве независимых координат X, Y, Z [9]. Стартовые значения углов вращения в процессе минимизации соответствовали низкоэнергетическим конформационным состояниям N-ацетил- α -аминокислот, взятых из [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.1 приведены модель молекулы Leu-галлатостатина 4, обозначения варьируемых углов вращения вокруг связей в основной (ω , ϕ , ψ) и боковых цепях (χ) составляющих молекулу аминокислотных остатков, а также схема поэтапного расчета, включающего независимое исследование конформационных состояний отдельных фрагментов молекулы.

ТЕТРАПЕПТИД ASN¹-ARG²-PRO³-TYR⁴. N-концевая тетрапептидная последовательность молекулы Leu-галлатостатина 4 содержит остатки с объемными боковыми цепями: положительно заряженной в Arg, полярной в Asn и неполярной в случае тирозина. В отличие от других представителей семейства галлатостатинов [9], Leu-галлатостатин 4 содержит один остаток пролина в третьем положении от N-конца валентной цепи молекулы. Жесткое пирролидиновое кольцо Pro фиксирует угол поворота на значении, приблизительно равном -60° , поэтому конформационная энергия пролина зависит только от угла поворота ψ . Кроме того, CH₂- группа, связанная с азотом имида накладывает стерические ограничения на область возможных конформаций предшествующего остатка, в частности, в R области аргинина. Поэтому общее число начальных вариантов, составленных для процедуры минимизации на тетрапептидном фрагменте составило 701. Они соответствуют 4 возможным шейпам и 27 формам основной цепи молекулы. При составлении начальных приближений учтены особенности расположения остатков в пептидной цепи в зависимости от типа шейпа. Выбраны такие ориентации боковых цепей, которые привели бы к энергетически выгодным межостаточным взаимодействиям. Низкоэнергетические конформационные состояния тетрапептида представлены 99 структурными вариантами, энергетическое распределение которых схематически представлено на рис.2. Они характеризуются полусвернутыми и развернутыми формами основной цепи. Анализ вкладов межостаточных взаимодействий в таких конформациях показал, что наибольший вклад в стабилизацию полученных структур вносят взаимодействия между остатками в пределах ди- и трипептидных участков фрагмента. Конформации полностью развернутого шейпа eee характеризуются слабыми тетрапептидными взаимодействиями, но образуют доста-

точно эффективные трипептидные взаимодействия между Arg и Tyr, энергетические вклады от которых составляют ~ -5.0 ккал/моль. В конформациях шейпа *fef* центром электростатической стабилизации является заряженная боковая цепь аргинина, образующая эффективные контакты с Pro и Tyr в 3-м и 4-ом положениях аминокислотной последовательности.

Arg в целом играет важную роль в формировании низкоэнергетических структур тетрапептидного фрагмента молекулы Leu-галлатостатина 4. Учитывая возможность реализации на свободном фрагменте конформаций всех четырех шейпов, они были включены в расчетную схему на больших фрагментах молекулы.

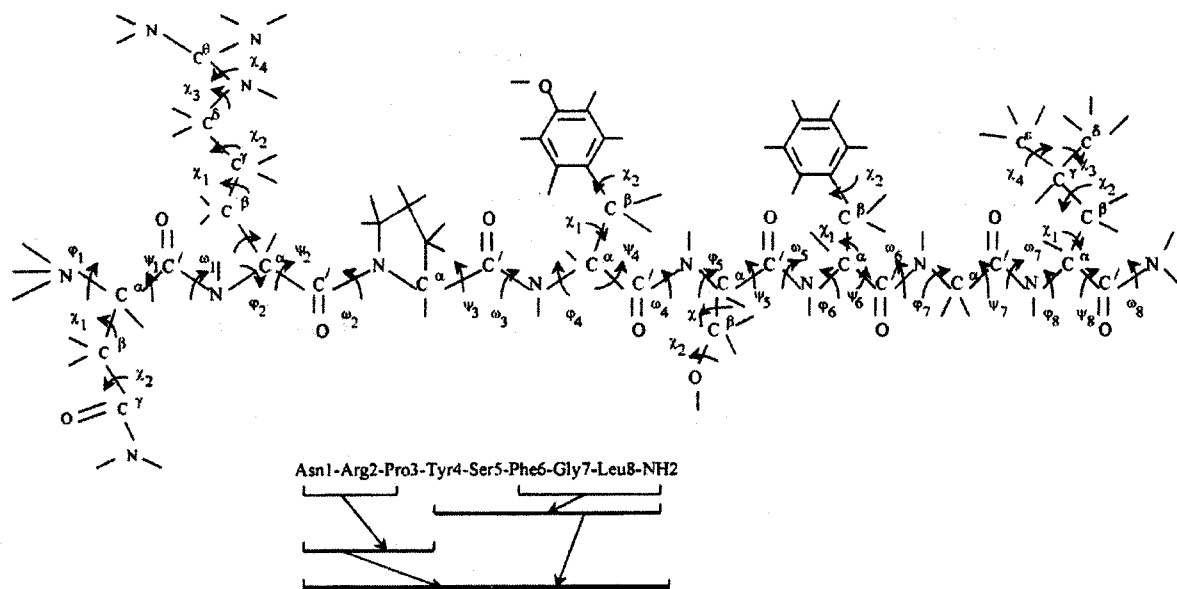
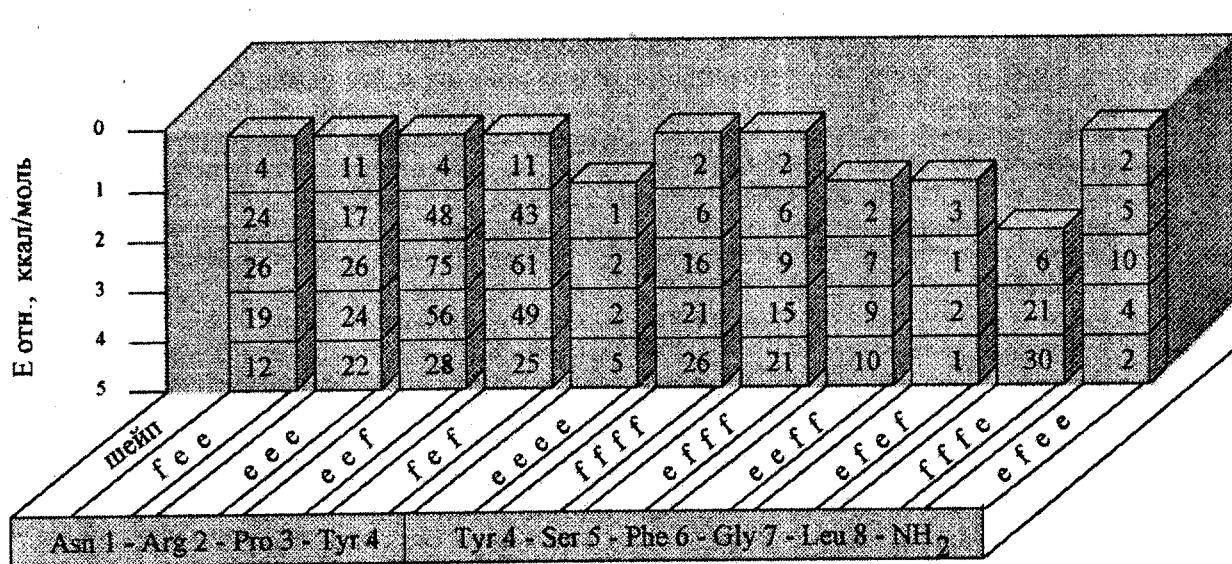


Рис. 1. Модель и схема расчета молекулы Leu – галлатостатина 4.

ПЕНТАПЕПТИД TYR⁴-SER⁵-PHE⁶-GLY⁷-LEU⁸-NH₂. Конформационные состояния С-концевого пентапептида молекулы Leu-галлатостатина 4 были оценены на основе

низкоэнергетических состояний перекрывающихся фрагментов согласно схеме, приведенной на рис.1.



Цифры в вертикальных столбцах характеризуют число конформаций

Рис.2. Энергетическое распределение конформаций в фрагментах молекулы Leu – галлатостатина 4.

В интервал относительной энергии 0 – 1 ккал/моль попадает одинаковое число конформаций шейпов *ffff*, *efff* и *efee* (рис.2). Наибольшее число конформаций в интервале относительной энергии 0-3 ккал/моль α -спиральные структуры шейпа *ffff*. Конформации шейпов *ffff* и *efff* отличаются двугранными углами основной и боковой цепи остатка Туг, в зависимости от которых оказываются различными энергетические вклады от взаимодействий с С-концевым лейцином. В случае свернутой в сторону валентного остова боковой цепи Туг (конформация $B_3R_1B_2PR_{31}$) его контакты с Leu на конце фрагмента наиболее эффективны (максимальный вклад от энергии взаимодействия составляет -5.0 ккал/моль). Развернутая боковая цепь Туг (конформация $R_2R_1B_3PR_{31}$) участвует в формировании эффективных контактов лишь в пределах дипептидного фрагмента молекулы (~ -3 ккал/моль). Во всех структурах шейпов *ffff* и *efff* образуются характерные для α -спиральных конформаций водородные связи между атомами кислорода карбонильной группы и атомами водорода амидной группы : NH (Туг) - OC (Leu) пептидных звеньев. Водородные связи образуются и в других конформациях, но они не носят упорядоченный характер. Конформации шейпов *eeee* и других шейпов с полусвернутыми формами основной цепи уступают предыдущим структурам только по вкладу дисперсионных взаимодействий. Наиболее эффективные межостаточные взаимодействия образует Phe. Суммарный вклад от энер-


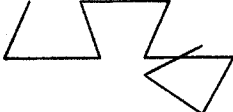

гии ди- и трипептидных взаимодействий Phe составляет - 3.1 и -2.4 ккал/моль.

LEU-ГАЛЛАТОСТАТИН 4. Конформационный анализ молекулы Leu-галлатостатина 4 согласно схеме на рис.1 проведен на основе сочетания результатов расчета перекрывающихся по остатку Туг тетра- и пентапептидных фрагментов. Всего было составлено 755 начальных приближений, соответствующих 42 возможным шейпам и 113 формам основной цепи молекулы. В исходных вариантах учитывались различные конформационные состояния и ориентации боковой цепи Туг⁴ для максимального создания благоприятных межостаточных взаимодействий тирозина. Энергетическое распределение конформаций октапептида, низкоэнергетические конформационные состояния и вклады внутри- и межостаточных взаимодействий наиболее оптимальных структур молекулы схематически приведены на рис.3 и таблицах 1,2.

Таким образом на основе проведенных исследований можно сделать вывод о реализации α -спиральной структуры Leu-галлатостатина и ограниченной конформационной подвижности его пептидного остова, о чем свидетельствует количество конформаций (7), попадающих в интервал относительной энергии 0-2 ккал/моль. Различия касаются конформационных состояний N-концевого трипептида в шейпах *feffff* и *eeffff*.

Таблица 1.

Геометрические параметры (в град) низкоэнергетических конформаций молекулы Leu-галлатостатина 4.

Аминокислота	К о н ф о р м а ц и и								
	φ	ψ	ω	φ	ψ	ω	φ	ψ	ω
Asn ¹	$\varphi=-92$ $\chi_1=184$	$\psi=-52$ $\chi_2=78$	$\omega=171$	$\varphi=-100$ $\chi_1=180$	$\psi=-60$ $\chi_2=90$	$\omega=180$	$\varphi=57$ $\chi_1=188$	$\psi=79$ $\chi_2=85$	$\omega=179$
Arg ²	$\varphi=-130$ $\chi_1=66$ $\chi_4=179$	$\psi=82$ $\chi_2=180$ $\chi_5=180$	$\omega=178$	$\varphi=-129$ $\chi_1=57$ $\chi_4=179$	$\psi=147$ $\chi_2=184$ $\chi_5=179$	$\omega=183$	$\varphi=-128$ $\chi_1=61$ $\chi_4=180$	$\psi=82$ $\chi_2=181$ $\chi_5=180$	$\omega=179$
Pro ³		$\psi=-31$	$\omega=196$		$\psi=-62$	$\omega=183$		$\psi=-33$	$\omega=195$
Tyr ⁴	$\varphi=-95$ $\chi_1=58$	$\psi=-33$ $\chi_2=89$	$\omega=184$	$\varphi=-114$ $\chi_1=184$	$\psi=141$ $\chi_2=87$	$\omega=184$	$\varphi=-98$ $\chi_1=57$	$\psi=-30$ $\chi_2=89$	$\omega=187$
Ser ⁵	$\varphi=-98$ $\chi_1=181$	$\psi=-60$ $\chi_2=180$	$\omega=186$	$\varphi=-99$ $\chi_1=58$	$\psi=142$ $\chi_2=183$	$\omega=184$	$\varphi=-95$ $\chi_1=181$	$\psi=-60$ $\chi_2=180$	$\omega=186$
Phe ⁶	$\varphi=-88$ $\chi_1=178$	$\psi=-48$ $\chi_2=86$	$\omega=184$	$\varphi=-118$ $\chi_1=-59$	$\psi=152$ $\chi_2=89$	$\omega=187$	$\varphi=-88$ $\chi_1=178$	$\psi=-49$ $\chi_2=86$	$\omega=184$
Gly ⁷	$\varphi=-63$	$\psi=-53$	$\omega=174$	$\varphi=78$	$\psi=-65$	$\omega=173$	$\varphi=-64$	$\psi=-53$	$\omega=175$
Leu ⁸	$\varphi=-86$ $\chi_1=177$ $\chi_4=175$	$\psi=-54$ $\chi_2=61$ $\chi_5=180$	$\omega=179$	$\varphi=-94$ $\chi_1=176$ $\chi_4=175$	$\psi=-56$ $\chi_2=61$ $\chi_5=180$	$\omega=179$	$\varphi=-86$ $\chi_1=177$ $\chi_4=175$	$\psi=-54$ $\chi_2=61$ $\chi_5=180$	$\omega=179$
шейп	<i>feffff</i> 			<i>fejeeff</i> 			<i>eeffff</i> 		
форма	$R_{21}B_3RR_1R_2R_2RR_{21}$			$R_{22}B_1RB_2B_1B_3PR_{21}$			$L_{22}B_3RR_1R_2R_2RR_{21}$		
	Энергетические вклады, ккал/моль								
$E_{нв}$	-43.0			-39.6			-42.1		
$E_{эл}$	3.2			3.0			3.2		
$E_{тор}$	5.1			2.7			5.1		
$E_{полная}$	-34.8			-33.9			-33.8		

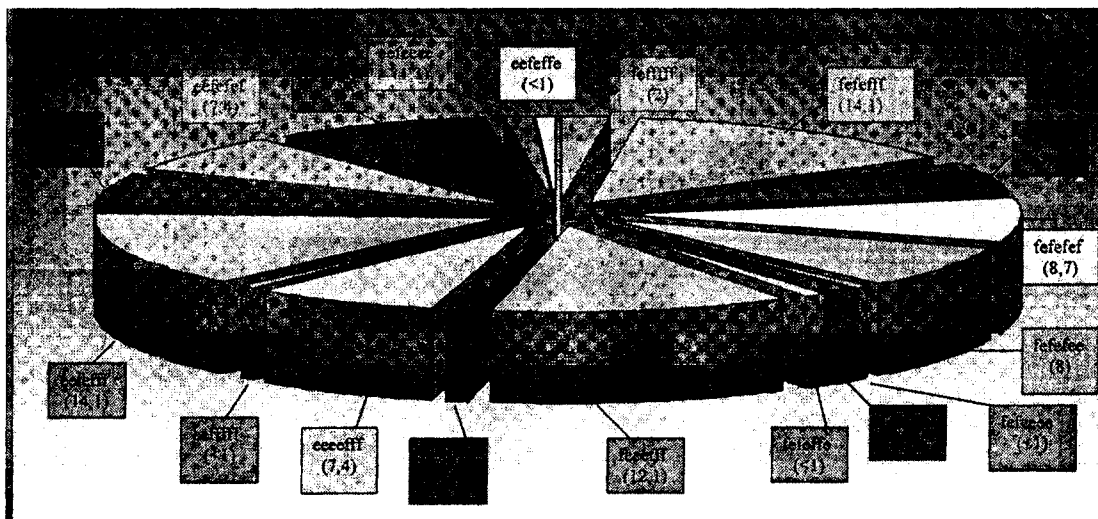


Рис.3. Число низкоэнергетических конформаций (в%) шейпов молекулы Leu-галлатостатина 4 ($E_{отн} = 0-5$ ккал.моль)

Анализ внутри- и межстаточных взаимодействий в конформациях этих шейпов свидетельствует о важной роли ди-, три- и тетрапептидных взаимодействий в формировании α -спиральных структур, суммарные энергетические вклады от которых в глобальной конформации нейропептида (табл.1) составляют -11.8, -7.5 и -4.5 ккал/моль, соответственно. Конформация $L_{22}B_3RR_1R_2R_2RR_{21}$ шейпа $eeffff$ с развернутым N-концевым участком всего на 1.1 ккал/моль отличается от глобальной структуры. Конформации Leu-галлатостатина 4 в других возможных шейпах нейропептида стабилизированы межстаточными взаимодействиями Arg^2 с Tyr^4 и Ser^5 (~ -4 ккал/моль) и характеризуются менее упорядоченной структурой пептидного оства.

Обобщая результаты проведенных исследований можно утверждать, что наиболее стабильными и вероятными для реализации биологических свойств молекулы Leu-галлатостатина 4 являются конформации, близкие по параметрам пептидного оства к α -спиральной структуре. Изучение влияния подвижности боковых групп аминокислотных остатков на стабильность пептидного оства в таких конформациях показало, что боковые цепи Tyr^4 , Phe^6 и Leu^8 направлены в сторону от α спирали и стабилизированы в основном ближними взаимодействиями.

Таблица 2.
Энергетические вклады (ккал/моль) внутри- и межстаточных взаимодействий в низкоэнергетических конформациях молекулы Leu-галлатостатина 4

Asn ¹	Arg ²	Pro ³	Tyr ⁴	Ser ⁵	Phe ⁶	Gly ⁷	Leu ⁸	
-0.49	-2.24	-1.31	-0.25	-0.02	-0.07	-0.02	-0.01	
0.06	-2.74	-0.42	-0.08	0.02	-0.02	0.00	0.00	Asn ¹
-0.45	-1.64	-2.12	-0.27	-0.01	-0.01	0.01	0.00	
	0.24	-3.23	-3.32	-2.57	-3.63	-1.02	-0.24	
	0.57	-2.68	-3.00	-2.48	-3.10	-0.07	-0.26	Arg ²
	0.26	-3.22	-2.67	-2.03	-3.39	-2.19	-0.22	
		0.13	-1.10	-0.69	-0.41	-1.69	-1.53	
		0.32	-0.58	-0.32	-0.06	0.00	0.00	Pro ³
		0.15	-1.39	-0.70	-0.33	-1.23	-2.09	
			0.38	-2.30	-0.58	-0.46	-2.33	
			-0.52	-3.30	-4.73	-0.05	-0.02	Tyr ⁴
			0.32	-2.05	-0.55	-0.40	-2.52	
				0.94	-1.08	-0.67	-0.84	
				0.88	-1.59	-0.25	-0.82	Ser ⁵
				0.94	-1.09	-0.64	-0.82	
					-0.22	-0.68	-0.96	
					-0.11	-0.39	-1.80	Phe ⁶
					-0.22	-0.77	-0.93	
						1.32	-1.15	
						1.29	-1.04	Gly ⁷
						1.32	-1.15	
							-1.02	
							-1.11	Leu ⁸
							-1.02	

*Примечание. В строках 1-3 приведены данные для низкоэнергетических конформаций шейпов $feffff$, $fefeff$ и $eeffff$ соответственно.

Наличие сравнимых по стабильности конформационных состояний нейропептида свидетельствует о возможности последовательных конформационных переходов, обусловленных специфическим окружением молекулы на разных этапах ее функционирования.

Авторы сохраняют за собой право на графическое изображение распределения конформаций, которое впервые приведено в данном сообщении.

-
- [1] *H. Duve, A.H. Johnsen, A. Thorpe.* Biol.Chem., 1994, v.269, №33, p.21059-21066.
- [2] *H. Duve, A.H. Johnsen, A. Thorpe.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, v.90, p.2456-2460.
- [3] *H. Duve, A.H. Johnsen, A.G. Scott.* Regul.Pept., 1995, v.57, №3, p.237-245.
- [4] *H. Duve, A.H. Johnsen, J.L. Maestro et all.* Regul.Pept., 1996, v.67, №1, p.11-19
- [5] *H. Duve, A. Thorpe.* Cell and Tissue Research, 1994, v.276, №2, p.367-379
- [6] *P. East, K.Tregenza, H. Duve et all.* Regul.Pept., 1996, v.67, №1, p.1-9
- [7] *Е.М. Попов.* Структурная организация белков», М., Наука, 1989, 352с.
- [8] *Е.М. Попов.* Int.J.Quant.chem., 1979, v.16, p.707-737.
- [9] *Л.И. Велиева, И.Н. Алиева, Д.И. Алиев, Н.М. Годжаев.* Журнал Физика, 2000, №1, с.19-23.

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

LEU-QALLATOSTATİN 4 MOLEKULUNUN FƏZA QURULUŞU

Nəzəri konformasiya analizi üsulu ilə Leu-qallatostatın 4 molekulunun fəza quruluşu öyrənilmiş və göstərilmişdir ki, bu neyropeptidin stabil konformasiyası peptid gövdəsinin hündəsi parametrlərinə görə α -spiral quruluşuna yaxındır.

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

SPATIAL STRUCTURE OF LEU-CALLATOSTATIN 4 MOLECULE.

Three-dimensional structure of the Leu-callatostatin 4 molecule has been studied by the method of theoretical conformational analysis. It was shown that geometrical parameters of neuropeptide stable conformations are close to the parameters of α -helical – type structures.