

УДК 547.962.541.63

**КОНФОРМАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ СВЯЗЫВАНИЯ ДВУХВАЛЕНТНОГО
КАТИОНА ТЕТРАПЕПТИДНЫМ СЕГМЕНТОМ, СОДЕРЖАЩИМ ОСТАТОК
АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

Г.А. АГАЕВА

*Бакинский Государственный Университет
370145, Баку, ул. З. Халилова, 23*

Методом теоретического конформационного анализа исследовано пространственное строение тетрапептидного сегмента Ala-Ala-Asp-Ala как в свободном состоянии, так и в присутствии модели двухвалентного катиона. Было показано, что для тетрапептида в свободном состоянии характерно образование квазициклической конформации, стабилизированной водородной связью между атомами концевых групп молекулы. Полученные результаты позволили предположить стабильную расчетную модель хелатирования двухвалентного катиона тетрапептидным сегментом Ala-Ala-Asp-Ala в зависимости от его конформационных возможностей.

ВВЕДЕНИЕ

Установлено, что ионы металлов принимают участие в реализации функции различных пептидных биорегуляторов. Согласно современным представлениям, потенцирование активности пептидов ионами металлов происходит путем стабилизации их активной конформации при образовании комплексов ион-пептид. Необходимым этапом в выяснении механизма этого процесса является изучение пространственного строения таких ионсвязывающих пептидов для определения типа комплекса и степени его стабильности, исходя из конформационных особенностей пептида-лиганда. Только сугубо специфическая конформация молекулы создает необходимые условия для осуществления ионсвязывания. В работе [1] потенциметрически и методами оптической КД и ЭПР спектроскопии были исследованы взаимодействия тетрапептида Ala-Ala-Asp-Ala (A_3D) с двухвалентным катионом Cu (II). Было зарегистрировано образование трех типов комплексов между Cu (II) и A_3D , отличающихся числом и природой атомов тетрапептида, координированных атомом металла, вследствие их различной протонизации. Конформационные возможности свободного тетрапептидного лиганда и степень стабильности образующихся типов комплексов в работе [1] не определялись. Поэтому цель настоящего исследования заключалась в детальном изучении с помощью метода теоретического конформационного анализа пространственного строения тетрапептида Ala-Ala-Asp-Ala как свободного лиганда в отсутствие иона, а затем и в присутствии иона – двухвалентного катиона- для установления центров хелатирования и строения образующихся стабильных комплексов.

МОДЕЛЬ И МЕТОД РАСЧЕТА

Исследование пространственного строения и механизма ионсвязывания тетрапептидным сегментом Ala-Ala-Asp-Ala проводилось методом теоретического конформационного анализа. Пространственное строение тетрапептида Ala-Ala-Asp-Ala в свободном состоянии, т.е. в отсутствие иона, проводилось на основе известных низкоэнергетических конформационных состояний отдельных монопептидов, составляющих этот тетрапептид. Расчет проводили в предположении жесткой валентной схемы, т.е. при фиксированных значениях длин связей и валентных углов стандартных аминокислотных остатков. Конформации, отвечающие минимальной энергии, находили путем изучения зависимости полной конформационной энергии структур тетрапептида

от вращения двугранных углов в пространстве. При расчете полной конформационной энергии учитывались энергетические вклады невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и водородных связей. Используемые в расчетах параметры потенциалов невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии образования водородных связей заимствованы из работ [2-6]. Невалентные взаимодействия оценивались по потенциалу Леннарда-Джонса с параметрами Скотта и Шераги [7]. Электростатическую энергию рассчитывали в монополярном приближении по закону Кулона с использованием зарядов, предложенных Шерагой [8]. Параметризация потенциальных функций была аппроксимирована к условиям полярной среды: величина диэлектрической проницаемости принята равной 10 [9]. Водородные связи, оцениваемые по потенциалу Морзе, предполагались ослабленными и максимальная энергия на равновесном расстоянии принята равной -1.5 ккал/моль [9]. Отсчет углов внутреннего вращения проводили согласно правилам IUPAC-IUB [10].

Исследование пространственного строения тетрапептида Ala-Ala-Asp-Ala в присутствии двухвалентного катиона проводилось с использованием предлагаемой расчетной модели катиона (X^{2+}), которой были присвоены невалентные параметры алифатического атома водорода из-за простоты его электронной структуры. И поскольку ван-дерваальсовый радиус водорода составляет 1,2 Å, то область отталкивания потенциалов Леннарда-Джонса для этого атома является менее крутым, чем для любого другого атома металла.

Обычно в пептидных молекулах в хелатировании атомов металла участвуют атомы кислорода карбоксилатных и карбонильных групп посредством координационных связей. Как известно, возникновение координационной связи обусловлено передачей электронной пары с целиком заполненной орбитали лиганда (донора) на вакантную орбиталь центрального атома (акцептора) и образованием общей связывающей молекулярной орбитали. Следовательно, природа координационной связи подобна природе обычной полярной ковалентной связи. Поэтому для удобства расчетов двухвалентный катион (X^{2+}), которому были присвоены невалентные параметры алифатического атома водорода, был присоединен к одному атому кислорода карбоксилатной группы, имеющейся в тетрапептиде на расстоянии 2,3 Å с углом связи $C^{\gamma}-O-X^{2+}$ равным 125° , ковалентной связью. Такая специфическая ковалентная фиксация модели двухвалентного катиона X^{2+} была заимствована нами из работы [11]. Использование такой фиксации двухвалентного катиона позволяет выявить хелатирующие агенты на тетрапептиде Ala-Ala-Asp-Ala.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конформационный анализ тетрапептида Ala-Ala-Asp-Ala в свободном состоянии проводился на основе низкоэнергетических конформационных состояний соответствующих аминокислотных остатков. На Рис.1 приведена расчетная модель исследуемого тетрапептида.

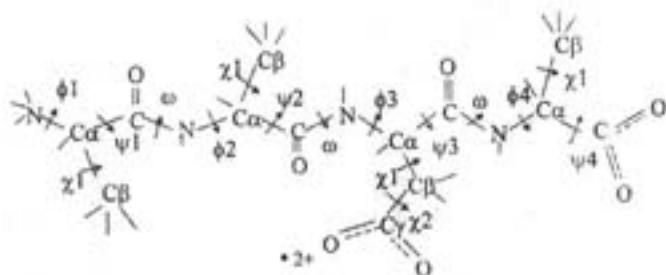


Рис.1
Расчетная модель тетрапептидного сегмента Ala-Ala-Asp-Ala.

Как видно из рисунка, аминокислотная последовательность тетрапептида состоит из трех остатков аланина (Ala) и одного остатка аспарагиновой кислоты (Asp), боковая

цепь которой содержит отрицательно заряженную карбоксилатную группу COO^- . На С-конце тетрапептида имеется еще одна карбоксилатная группа. Боковые цепи остатков Ala содержат одну метильную группу, вращение которой равновероятно в трех положениях боковой цепи ($60^\circ, 180^\circ, -60^\circ$). Начальные приближения для расчетных структурных вариантов составлялись из значений двугранных углов ϕ и ψ трех низкоэнергетических областей В, R и L. При этом угол χ_1 боковой цепи остатка Asp варьировался во всех трех положениях $60^\circ, 180^\circ$ и -60° . Значение второго угла χ_2 боковой цепи остатка Asp оставалось неизменным - 90° . Всего было составлено и рассчитано 102 структурных варианта тетрапептида Ala-Ala-Asp-Ala. Как показал расчет, энергетически предпочтительными оказались конформации шейпа fff, формирующие α -спиральную структуру. В Таблице 1 приведены энергетические параметры оптимальных конформаций тетрапептида.

Таблица 1

Энергетические параметры оптимальных конформаций тетрапептида Ala-Ala-Asp-Ala в свободном состоянии.

Конформации тетрапептида в отсутствии модели двухвалентного катиона						
№	Шейп	Форма основной цепи	Энергетические вклады (ккал/моль)			
			$E_{\text{нев}}$	$E_{\text{вдс}}$	$E_{\text{тор}}$	$E_{\text{общ}}$
1.	eee	BBBB	-5.9	3.2	1.6	-1.2
		LBBR	-6.1	4.7	1.6	0.1
		RLBR	-4.0	5.2	1.6	2.9
		LLBR	-6.0	1.8	1.6	-2.7
2.	eef	BBRR	-5.5	3.5	1.6	-0.4
		LBRR	-5.7	3.3	1.6	-0.8
		RLRR	-5.0	4.5	1.9	1.0
		LLRR	-5.1	-3.1	2.7	-5.4
3.	efe	BRBR	-5.9	2.6	1.6	-1.6
		LRBR	-7.2	4.2	2.4	-0.6
4.	eff	BRRR	-5.9	2.6	1.6	-1.6
		LRRR	-6.1	-0.8	2.2	-4.7
5.	fee	RBBR	-6.8	1.5	2.2	-3.1
		BLBR	-2.3	1.2	1.1	0.0
6.	fef	RBRR	-6.1	4.0	1.6	-0.5
		BLRR	-5.7	-2.6	2.4	-5.9
7.	f̄fe	RRBR	-8.3	0.7	3.4	-4.1
8.	fff	RRRR	-4.0	-4.8	1.3	-7.5

В интервал относительной энергии 0-3 ккал/моль вошли оптимальные конформации только двух шейпов fff и fee, из восьми возможных для тетрапептида. Остальные конформации обладают сравнительно высокой относительной энергией. Самые низкоэнергетические конформации тетрапептида RRR_2R и RRR_3R шейпа fff формируют квазициклические структуры, благодаря образованию водородных связей между атомами ионизированных N- и С-концевых групп тетрапептида. Расстояние между атомами водорода и кислорода в этих водородных связях составляет 1,9-2,2Å. В α -спиральных конформациях тетрапептида основной стабилизирующий энергетический вклад вносят электростатические взаимодействия. В конформации RRR_2R , например, вклад электростатических взаимодействий превышает вклад невалентных взаимодействий на 1ккал/моль. В остальных конформациях, наоборот, решающий вклад в стабилизацию структур вносят невалентные взаимодействия. Однако, наличие ионизированных групп в первичной структуре тетрапептида способствует образованию стабильных специфических

контактов электростатического характера между противоположно заряженными N- и C-концевыми группами и карбоксилатной группой остатка Asp во всех структурах молекулы.

На втором этапе данного исследования был проведен конформационный анализ тетрапептида Ala-Ala-Asp-Ala в присутствии модели двухвалентного катиона. С этой целью ион X^{2+} был присоединен к одному атому кислорода карбоксилатной группы тетрапептида на расстоянии 2,3 Å с углом связи $C^{\gamma}-O-X^{2+}$ равным 125° . Поскольку в тетрапептиде имеются две карбоксилатные группы COO^{-} , которые могут участвовать в хелатировании двухвалентного катиона, модель иона была присоединена, в одном случае, к одному атому кислорода карбоксилатной группы боковой цепи остатка Asp, а в другом случае, к одному атому кислорода C-концевой карбоксилатной группы. Для каждого случая отдельно, в качестве начальных приближений, были рассмотрены 14 низкоэнергетических конформаций свободного тетрапептида, входящие в интервал относительной энергии 0-5 ккал/моль, со специфически связанным ионом X^{2+} и с шестью различными величинами двугранного угла $C^{\gamma}-O-X^{2+}$, ориентирующего данный ион. Образующийся суммарный двугранный угол вращения вокруг $C^{\gamma}-O$ связи определялся позицией катиона X^{2+} . Этому двугранному углу были даны первоначальные величины 0° , $\pm 60^{\circ}$, $\pm 120^{\circ}$ и 180° . Расчет показал, что более стабильные комплексные структуры реали-

Таблица 2

Энергетические и геометрические параметры оптимальных конформаций тетрапептида Ala-Ala-Asp-Ala в присутствии модели двухвалентного катиона.

Конформации тетрапептида в присутствии модели двухвалентного катиона							
№	Шейп	Форма основной цепи	Координационное Число	Энергетические вклады (ккал/моль)			
				$E_{нев.}$	$E_{элс.}$	$E_{тор.}$	$E_{общ.}$
1.	Eee	BBBB	6	0.9	-48.0	3.3	-43.8
		LBRR	6	-1.1	-47.9	3.9	-45.2
		RLBR	6	-1.4	-46.4	3.7	-44.2
		LLBR	6	-2.8	-46.1	4.3	-44.7
2.	Eef	BBRR	4	-3.3	-34.3	3.8	-33.8
		LBRR	4	-3.6	-33.4	3.5	-33.5
		RLRR	4	-2.8	-33.2	3.8	-32.2
		LLRR	4	-3.8	-35.8	3.3	-36.4
3.	Efe	BRBR	6	0.4	-49.3	3.2	-45.7
		LRBR	6	-1.0	-48.1	3.9	-45.2
4.	Eff	BRRR	4	-1.6	-34.6	2.5	-33.7
		LRRR	4	-3.7	-33.1	3.3	-33.5
5.	Fee	RBBR	6	0.3	-48.7	3.8	-44.6
		BLBR	6	0.9	-47.7	3.1	-43.7
6.	Fef	RBRR	4	-3.2	-33.6	3.5	-33.4
		BLRR	4	-2.8	-33.5	3.8	-32.6
7.	Ffe	RRBR	6	-1.3	-50.0	4.3	-47.0
8.	Fff	RRRR	4	-2.6	-39.2	2.4	-39.5

зуются в случае присоединения модели катиона к атому кислорода карбоксилатной группы остатка Asp, чем в случае присоединения иона к атому кислорода C-концевой группы. В обоих случаях, однако, включение модели иона в структуру оптимальных

конформаций тетрапептида значительно увеличивает их конформационную стабильность. Почти на 20 ккал/моль стабильнее оказались структуры с фиксированным ионом в боковой цепи остатка Asp.

Результаты минимизации показали, что наиболее подходящими для хелатирования иона оказались конформации тетрапептида, относящиеся к четырем шейпам eee, ffe, fee и efe с соответствующими формами основной цепи. Следует отметить, что формы основных цепей этих конформаций характеризуются транс-конфигурацией последней пептидной связи Asp-X, что, по всей видимости, является необходимым структурным требованием для образования энергетически предпочтительной комплексной структуры. В Таблице 2 приведены энергетические и геометрические параметры оптимальных конформаций тетрапептида в присутствии модели двухвалентного катиона.

Предполагается, что тетрапептид в связанном с ионом состоянии может образовать четыре типа комплексов в низкоэнергетических структурах шейпов eee, efe, ffe и fee. Энергетически самая предпочтительная среди них структура тетрапептида имеет форму основной цепи RRBR, которая относится к шейпу ffe. Расчет рассмотренных структур показал, что хелатирование иона в низкоэнергетических конформациях может происходить с наибольшим координационным числом (6), т.к. межатомные расстояния пяти атомов кислорода и одного атома азота в окружении иона удовлетворительны для его хелатирования. Было показано, что в хелатировании модели иона могут участвовать четыре атома кислорода двух карбоксилатных групп и атомы кислорода и азота последней пептидной группы пептида.

Итак можно заключить, что если для тетрапептида в свободном состоянии энергетически предпочтительной конформацией оказалась полностью свернутая α -спиральная структура с формой основной цепи RRRR, то в связанном с ионом состоянии энергетически предпочтительной становится развернутая с C-конца конформация с формой RRBR. Отсюда можно предположить, что под влиянием двухвалентного катиона в α -спиральной структуре свободного тетрапептида пептидная связь Asp-X из цис-конфигурации переходит в транс-конфигурацию (RRRR \rightarrow RRBR). На Рис.2 приведены стереорисунки α -спиральной конформации тетрапептида в свободном состоянии и в связанном с ионом состоянии с формой основной цепи RRBR. Тем самым проведенный конформационный анализ предположил следующий механизм хелатирования двухвалентного катиона тетрапептидом Ala-Ala-Asp-Ala, согласно которому комплексная структура реализуется в его стабильной конформации с транс-формой пептидного остова остатка Asp и, где ион X^{2+} располагается внутри полости, образованной основной цепью, и координирован атомами кислорода карбоксилатной группы остатка Asp и C-концевой карбоксилатной группой, а также атомами кислорода и азота последней пептидной группы.

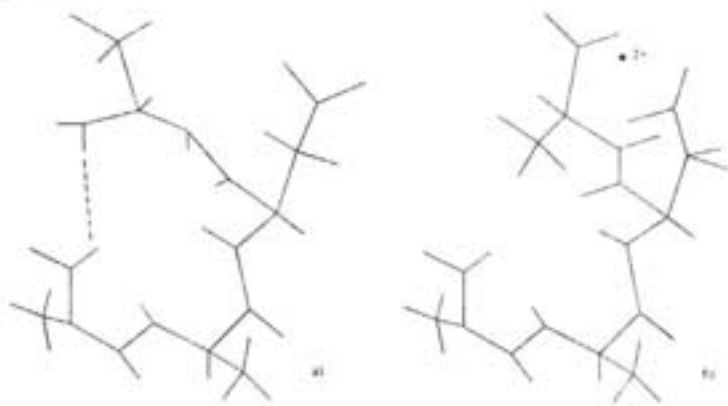


Рис.2

Стереорисунки тетрапептида в α -спиральной конформации в отсутствии иона, пунктирной линией показана водородная связь (а), и тетрапептида в связанном с ионом состоянии в форме пептидного остова RRBR (б).

Таким образом, на основе экспериментальных данных и результатов теоретического конформационного анализа предложена энергетически предпочтительная модель хелатирования двухвалентного катиона тетрапептидным сегментом Ala-Ala-Asp-Ala. Сопоставление полученных расчетных структур тетрапептида в свободном и в связанном с ионом состояниях позволило определить конформационные изменения, индуцируемые двухвалентным катионом и конкретно установить увеличение конформационной стабильности пространственных структур тетрапептидного сегмента при формировании комплекса.

1. R.V.Decock-le, Lebki A., Livera C. Pettit L.D. *Inorg.Chim.Acta*, **124** (1986) 19.
2. Е.М.Попов, *Int. J.Quant. Chem.*, **16** (1979) 707.
3. Г.А.Агаева, Н.А.Ахмедов, Е.М.Попов, *Молек.биол.*, **21** (1987) 164.
4. Г.А.Агаева, И.Б.Болотина, В.О.Чехов, *Биофизика*, **XXXIV** (1989) 14.
5. Н.М.Годжаев, Г.А.Агаева, *Биофизика*, **45** (2000) 581.
6. Н.М.Годжаев, И.С.Максумов, Л.И. Исмаилова, *Ж.Структ.хим.*, **24** (1983) 147.
7. R.A.Scott, H.A.Scheraga, *J.Chem.Phys.*, **45** (1966) 2091.
8. F.A. Momany, McGuire, A.W.Burgess, H.A.Scheraga, *J.Phys.Chem.*, **79** (1975) 2361.
9. Г.М.Липкинд, С.Ф.Архипова, Е.М. Попов Е.М., *Молек. биол.*, **4** (1970) 331.
10. IUPAC-IUB. Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochim. Biophys.Acta*, **1** (1971) 121.
11. M.A.Eastman, L.G.Pedersen, R.G.Hiskey, M.Pique, K.A.Koehler, K.E.Gottschalk, G.Nemethy, H.A.Scheraga, *Int.J.Peptide Protein Res.*, **27** (1986) 530.

TƏRKİBİNƏ ASPARAGİN TURŞUSU QALIQI DAXİL OLAN TETRAPEPTİD SEQMENTİNİN İKİVALENTLİ KATİONLA BİRLƏŞMƏSİNİN KONFORMASIYA XÜSUSİYYƏTLƏRİ. NƏZƏRİ TƏDQIQ

G.Ə. AĞAYEVA

Ala-Ala-Asp-Ala tetrapeptidinin sərbəst halda və ikivalentli kationla birləşmiş vəziyyətdə fəza quruluşu nəzəri konformasiya analizi üsulu ilə tədqiq olunmuşdur. Müəyyən olunmuşdur ki, Ala-Ala-Asp-Ala tetrapeptidi sərbəst halda enerji jəhətdən əlverişli olan α -spiral konformasiya əmələ gətirir. Bu konformasiya uç qrupların atomlarının əmələ gətirdiyi hidrogen rabitəsi vasitəsi ilə kvazisikl quruluşu yaradır. Ala-Ala-Asp-Ala tetrapeptidinin konformasiya imkanlarından asılı olaraq onun ikivalentli kationla əmələ gətirən ən əlverişli kompleks quruluşun hesablama modeli təklif olunmuşdur.

CONFORMATIONAL ASPECTS of the DIVALENT CATION BINDING by ASPARTATE CONTAINING TETRAPEPTIDE SEGMENT. THEORETICAL STUDY

G.A. AGAYEVA

The spatial structures of the tetrapeptide segment Ala-Ala-Asp-Ala in the absence and presence of a divalent cation have been investigated by theoretical conformational method. It was shown, that it is typical of tetrapeptide in the free state to adopt energetical favourable α -helix quasi-cyclic conformation, stabilizing by hydrogen bond between atoms of terminal groups. The obtained results permitted to suggest the stable model of divalent cation chelation by tetrapeptide segment Ala-Ala-Asp-Ala, depending of its conformational possibilities.

Редактор: М.Керимов