

## КОНФОРМАЦИОННЫЕ СОСТОЯНИЯ ГЛИЦИН - МОНОЗАМЕЩЕННЫХ АНАЛОГОВ НЕЙРОМЕДИНА NmU-8

Н.А.ИСАКОВА, И.Н.АЛИЕВА, Н.М.ГОДЖАЕВ

*Бакинский Государственный Университет  
AZ 1073, Баку, ул.З.Халилова, 23*

Методом теоретического конформационного анализа изучено влияние точечных замен аминокислотных остатков в первичной структуре нейромедина NmU-8 на конформационную стабильность природного нейропептида. Установлено, что замена ароматической аминокислоты в положении 2 пептидной цепи на глицин приводит к потере сократительной активности нейропептида, а гуанидиновая группа боковой цепи Arg<sup>5</sup> необходима для узнавания рецепторами нейромедина и его аналогов.

### ВВЕДЕНИЕ

Исследования структурно-функциональных взаимоотношений нейропептидных молекул основываются на синтезе, биологических испытаниях аналогов природных соединений и установлении структурных критериев, необходимых для проявления их функциональной активности. К числу таких объектов исследования относятся нейромедины NmU-8 и NmU-25, являющиеся продуктом расщепления сигнальной последовательности, впервые идентифицированной в [1]. NmU-8 (Tyr<sup>1</sup>-Phe<sup>2</sup>-Leu<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>-Arg<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-Arg<sup>7</sup>-Asn<sup>8</sup>-NH<sub>2</sub>), октапептидный C-концевой фрагмент NmU-25(18-25) был обнаружен в 1985 году в спинном мозге свиньи (p-NmU-8), а впоследствии - в тканях различных органов животных (собаки, d-NmU-8, крысы, r-NmU-8), птиц и рептилий [2-6]. Незначительное количество NmU-8 было обнаружено в различных областях мозга (гипоталамус, миндалина, аммонов рог, субстанция nigro и др.), жировых тканях, лимфоцитах и селезенке человека (h-NmU-8) [7-9].

В литературе описаны многочисленные химические модификации NmU-8, осуществленные с целью получения высокоэффективных аналогов нейропептида с пролонгированным эффектом действия [10-14]. В большинстве случаев предпринимались попытки замены L-остатков на их D-изомеры, оксикислоту или остаток глицина в положениях 1-8 линейной последовательности нейропептида.

Биологические испытания, проведенные на глицин - монозамещенных аналогах нейромедина и их сравнение с конформационными свойствами исследуемых соединений являются важным этапом при изучении взаимосвязи между структурой и активностью нейропептида. Глицин в отличие от других стандартных α-аминокислот не имеет боковой цепи и с равной вероятностью может находиться во всех областях конформационного пространства. Поэтому замена аминокислотного остатка на Gly значительно увеличивает конформационную свободу данного участка цепи и позволяет оценить роль отдельных остатков в формировании пространственной структуры нейропептида.

В работе [10] были синтезированы аналоги NmU-8, содержащие остаток глицина в положениях 2, 4, 5, 6 и 7 пептидной цепи. Изучение сократительной активности этих соединений показало, что замена Phe<sup>2</sup> и Arg<sup>5</sup> на Gly сопровождается резким снижением активности нейропептида. Аналоги [Gly<sup>4</sup>] - и [Gly<sup>7</sup>] NmU-8 воспроизводят биологические функции, присущие природной молекуле, а [Gly<sup>6</sup>]- NmU-8 сохраняет лишь следы её активности.

В данной работе изучено влияние указанных выше замен на конформационную подвижность, энергетические и геометрические характеристики стабильных конформаций природного нейропептида NmU-8, изучена роль каждого из замещаемых остатков в формировании пространственной структуры нейромединов.

### МЕТОД РАСЧЁТА

Исследование пространственного строения и конформационной подвижности L-глицин монозамещенных аналогов NmU-8 проводилось методом теоретического конформационного анализа. При конформационном расчёте использовались полуэмпирические потенциальные функции, описывающие невалентные, электростатические взаимодействия атомов, торсионную энергию и энергию образования водородных связей. Потенциальные функции были аппроксимированы к условиям водной среды. Величина диэлектрической проницаемости принята равной 10 [15], а водородные связи предполагались ослабленными (максимальная энергия при  $r_0=1,8\text{\AA}$  составляла 1,5 ккал/моль). Величины барьеров вращения вокруг одинарных связей взяты из работы [16]. В качестве начальных приближений при минимизации стартовых структур нейропептидов были использованы значения двугранных углов, соответствующие низкоэнергетическим состояниям монопептидов. Минимизация энергии проводилась методом сопряженных градиентов при фиксированных значениях длин связей и валентных углов. В расчетах были использованы программа и техника расчёта, разработанные и применённые авторами в работах [17-20]. Отсчёт двугранных углов проводился согласно общепринятой номенклатуре [21].

Набор полученных структур анализировали с использованием следующих параметров: (а) относительной конформационной энергии  $E_{\text{отн.}}$ ; (б) элементов пространственной структуры ( $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -повороты), а также (в) форм и шейпов пептидной цепи [20]. Под формой основной цепи пептида подразумевается последовательность форм остатков, определяемых низкоэнергетическими областями: R ( $\varphi, \psi = -180 \div 0^\circ$ ); B ( $\varphi = -180 \div 0^\circ, \psi = 0 \div 180^\circ$ ); L ( $\varphi, \psi = 0 \div 180^\circ$ ); и P ( $\varphi = 0 \div 180^\circ, \psi = -180 \div 0^\circ$ ) на конформационной карте по двугранным углам основной цепи  $\varphi$ - $\psi$ . Различные формы распределены по шейпам пептидного скелета, определяющим направленность хода основной цепи. В случае фрагмента из двух аминокислотных остатков все формы основной цепи могут быть объединены в два класса: шейпы *e* и *f*. Символом *e* обозначают формы с развёрнутой основной цепью (BB, BR, RL, LB, RP, PL, PP, LR), а *f* со свернутой (RR, RB, BL, LL, BP, LP, PR, PB).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование глицин – монозамещенных аналогов NmU-8 проводилось путем: (а) независимых расчетов конформационных состояний аналогов NmU-8, содержащих остаток Gly в положениях 2, 4, 5, 6 и 7 пептидной цепи и (б) исследования конформационных возможностей молекул в поле низкоэнергетических структур свободного нейропептида. В качестве стартовых структур для случая (б) были взяты конформационные состояния свободного нейропептида, содержащие  $\beta$ -поворот на участке Arg<sup>5</sup> - Asn<sup>8</sup> с относительной энергией 0 и 2,6 ккал/моль [22]. Они принадлежат шейпам *eeefefe* и *eeefeee*, соответственно.

Как следует из результатов расчета (Таблица 1) замена остатков Phe<sup>4</sup> и Arg<sup>7</sup> на Gly не вызывает изменений в иерархии структур, полученных для природного нейропептида. Оба аналога содержат  $\beta$ -поворот на участке Arg<sup>5</sup> и Asn<sup>8</sup>, о чем

свидетельствуют значения двугранных углов основной цепи (Таблица2) и расстояния между C<sup>α</sup> атомами остатков Arg<sup>5</sup> и Asn<sup>8</sup>, равные 5,8 и 6,2Å, соответственно.

**Таблица 1.**

Низкоэнергетические конформационные состояния глицин – монозамещенных NmU-8 и его аналогов.

| № | Аналог                    | Форма основной цепи  | Шейп    | Энергетические вклады, ккал/моль |                   |                 |                   |
|---|---------------------------|--|---------|----------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
|   |                           |  |         | E <sub>конф.</sub>               | E <sub>нев.</sub> | E <sub>эл</sub> | E <sub>торс</sub> |
| 1 | [Gly <sup>2</sup> ] NmU-8 | B <sub>1</sub> BR <sub>2</sub> R <sub>3</sub> B <sub>1</sub> RB <sub>3</sub> R <sub>32</sub>               | eefefe  | -28.2                            | -41.0             | 7.6             | 5.2               |
| 2 | [Gly <sup>4</sup> ] NmU-8 | L <sub>2</sub> B <sub>2</sub> R <sub>2</sub> PB <sub>1</sub> RB <sub>2</sub> R <sub>31</sub>               | eeefefe | -30.1                            | -39.9             | 5.5             | 4.2               |
| 3 | [Gly <sup>5</sup> ] NmU-8 | L <sub>2</sub> B <sub>2</sub> B <sub>2</sub> R <sub>2</sub> PRR <sub>2</sub> B <sub>11</sub>               | eeeefff | -35.9                            | -43.0             | 2.1             | 4.9               |
| 4 | [Gly <sup>6</sup> ] NmU-8 | L <sub>2</sub> B <sub>2</sub> B <sub>2</sub> R <sub>2</sub> B <sub>3</sub> PR <sub>3</sub> R <sub>32</sub> | eeeffff | -32.2                            | -46.0             | 9.2             | 4.6               |
| 5 | [Gly <sup>7</sup> ] NmU-8 | B <sub>3</sub> B <sub>3</sub> B <sub>2</sub> R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> RBB <sub>22</sub>               | eeefffe | -38.6                            | -46.3             | 1.6             | 6.8               |

**Таблица 2.**

Значения двугранных углов (град) в низкоэнергетических конформациях NmU-8 и его аналогов.

| Остаток | [Gly <sup>2</sup> ]NmU-8 | [Gly <sup>4</sup> ] NmU-8 | [Gly <sup>5</sup> ]NmU-8 | [Gly <sup>6</sup> ]NmU-8 | [Gly <sup>7</sup> ] NmU-8  |
|---------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 1       | -71,172,<br>178,67,94*   | -66,149,<br>173,174,78    | -69,148,172,<br>171, 78  | -68,142,173,<br>171,77   | 63,135,170,<br>173,78      |
| 2       | -71,86,177               | -127,137,<br>182,174,83   | -134,147,<br>179,182,88  | -141,148,<br>178,183,87  | -103,140,<br>185,173,92    |
| 3       | -85,-61,177,<br>198,176  | -95,-67,<br>183194,167    | -107,110,179,<br>195,168 | -106,107,<br>177,195,170 | -88,94,<br>167,197,172     |
| 4       | -95,-54,<br>178,-58,113  | 79,-79,179                | -99,-48,172,<br>186,88   | -101,-61,<br>175,177,69  | -99,-38,<br>176,62,87      |
| 5       | -136,144,<br>183,52,179  | -135,141,<br>183, 54,177  | 125,-95,183              | -135,101,<br>177,-73,173 | -126,110,<br>182,184,179   |
| 6       | -88,179                  | -94,184                   | -70,173                  | 87,-92,178               | -91,173                    |
| 7       | -107,100,<br>185,-61,180 | -106,104,<br>178,183,177  | -93,-56,181,<br>182,180  | -111,-59,182,<br>-63,180 | -84,66,175,<br>-84,66,175, |
| 8       | -93,-60,<br>180,-53,-79  | -110,-62,<br>180,-62,88   | -152,152,180,<br>55,89   | -102,-58,180,<br>-58,-84 | -126,127,<br>180,177,-91   |

\*Примечание: Величины двугранных углов даны в последовательности: φ,ψ,ω,χ<sub>1</sub>χ<sub>2</sub>. (для Pro - ψ,ω).

Из двенадцати предпочтительных структур, рассчитанных для NmU-8 [22] лишь две становятся высокоэнергетичными (E<sub>отн.</sub>>15ккал/моль). Запрещенными для аналогов [Gly<sup>4</sup>]- и [Gly<sup>7</sup>]-NmU-8 стали BB формы основной цепи (шейп e) дипептидных фрагментов Leu<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup> и Pro<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>. Изменение энергии конформационных состояний других аналогов [Gly<sup>4</sup>]- и [Gly<sup>7</sup>] NmU-8 не превышает 4,4ккал/моль. Причем такая замена влияет, в основном, на величину энергии дисперсионных взаимодействий, но не отражается на вкладах электростатических и торсионных взаимодействий. Таким образом, для обоих аналогов NmU-8 энергетически предпочтительными оказались глобальные конформации природного нейропептида, а остатки Phe<sup>4</sup> и Arg<sup>7</sup>, несмотря на

наличие объемных боковых цепей, не вовлечены в систему внутримолекулярных электростатических и торсионных взаимодействий. Полученные результаты согласуются с выводами работы [23], где предполагалось, что положительно заряженная боковая цепь Arg<sup>7</sup> ориентирована в окружающую среду и может служить центром электростатической стабилизации в межмолекулярных контактах нейромединов. На основе результатов проведенных исследований можно предположить, что аналоги [Gly<sup>4</sup>]- и [Gly<sup>7</sup>] NmU-8 в физиологических условиях будут воспроизводить биологические функции, присущие природной молекуле. Значительная конформационная дестабилизация происходит при замене остатков Phe<sup>2</sup> и Arg<sup>5</sup> на Gly. В низкоэнергетических конформациях природного нейропептида в результате таких замещений ухудшаются как дисперсионные взаимодействия, так и увеличивается величина вкладов электростатических взаимодействий. В целом относительные энергии всех конформаций аналогов [Gly<sup>2</sup>]- и [Gly<sup>5</sup>] NmU-8 увеличиваются на 8-13ккал/моль.

Таким образом, можно заключить, что остатки Phe<sup>2</sup> и Arg<sup>5</sup> играют существенную роль в формировании межостаточных взаимодействий во всех структурах нейропептида. Об этом свидетельствует также сравнительный анализ величин суммарных вкладов межостаточных взаимодействий, образуемых остатками Phe<sup>2</sup> и Arg<sup>5</sup> в низкоэнергетических конформациях нейропептида, энергия которых варьирует в пределах -13-15ккал/моль. Замена остатка Pro<sup>6</sup> на Gly приводит к увеличению конформационной подвижности нейропептида и образованию свернутой структуры на участке Phe<sup>4</sup>-Asn<sup>8</sup>, стабилизированной водородной связью между NH группой основной цепи Phe<sup>4</sup> и боковой цепью Asn<sup>8</sup>. Известно, что наличие остатка пролина в первичной структуре молекул ограничивает конформационную подвижность данного участка пептидной цепи. Поэтому аналог NmU-8, содержащий Gly в положении 6, существенно отличается по структуре от природного нейропептида и полностью теряет его функциональную активность. Именно поэтому из всех синтезированных аналогов NmU-8 только у молекулы [Gly<sup>6</sup>]-NmU-8 показатели биологической активности минимальны. Это объясняется тем, что замещение Pro<sup>6</sup> на Gly дестабилизирует необходимую для связывания с рецептором пространственную структуру нейропептида.

Сопоставление полученных результатов с данными биологических испытаний нейропептидов на изолированных гладких мышцах животных показало, что замена Phe<sup>2</sup> на неароматическую аминокислоту приводит к заметному уменьшению сократительной активности, в то время как в результате потери ароматического Phe<sup>4</sup> сохраняются функциональные свойства нейропептида NmU-8.

1. C.Austin, *J. Mol.Endocrinol.*, **14** (1995) 157.
2. N.Minamino, K.Kangawa, M.Matsuo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130** (1985) 1078.
3. N.Minamino T.Sudoh K.Kangawa M.Matsuo, *Peptides*, **6** (1985) 245.
4. R.Murphy, C.A.Turner J.B.Furness, L.Parker, A.Girand, *Peptides*, **11** (1990) 613.
5. F.O.Harte, C.S.Bockman, P.W.Abel, J.M.Conlon, *Peptides*, **12** (1991) 11.
6. C.S.Bockman, P.W.Abel J.W.Hicks, J.M.Conlon, *Eur. J. Pharmacol.*, **171** (1989) 255.
7. J.Domin, M.A.Ghatei, P.Chohan, S. R. Bloom, *Biochem.Biophys. Res.Comm.*, **140** (1986) 1127.

8. A.D.Howard R.Wang et al, *Nature*, **406** (2000) 70.
9. R.Raddatz, A.E.Wilson et al, *J. Biol.Chem.*, **275** (2002) 32452.
10. Т.Hashimoto, Н.Масуй, Y.Uchida, N.Sakura, K.Okimura, *Chem.Pharm.Bull*, **39** (1991) 2319.
11. Т.Hashimoto, K.Kurosawa, N.Sakura, *Chem.Pharm.Bull*, **43** (1995) 1154.
12. K.Kurosawa, N.Sakura, Т.Hashimoto, *Chem.Pharm.Bull*, **44** (1996) 1880.
13. N.Sakura, K.Kurosawa, Т.Hashimoto, *Chem.Pharm.Bull*, **48** (2000)1160.
14. Т.Abiko, Y.Takamura, *Prep. Biochem.Biotechnol*, **32** (2002) 79.
15. Е.М. Попов, *Int. J. Quantum Chem*, **16** (1979) 707.
16. F.A.Momany, R.F.McGuire, A.W.Burgess, H.A.Scheraga, *Phys. Chem.*, **79** (1975) 2361.
17. И.С.Максумов Л.И.Исмаилова., Н.М.Годжаев, *Журнал структурной химии*, **24** (1983) 147.
18. I.N.Alieva, L.I.Velieva, D.I.Aliev, N.M.Godjaev, *J.Peptide Sci.*, **8** (2002) 385.
19. I.N.Alieva, L.I.Velieva, D.I.Aliev, N.M.Godjaev, S.D.Demukhamedova, *J. Mol. Structure*, **68** (2004) 137.
20. Е.М.Попов, *Структурная организация белка, М., Наука*, (1989) 352.
21. IUPAC-IUB *Quantity, Units and Symbols in Physical Chemistry*, 39, *Blackwell Scientific, Publications, Oxford*, (1988).
22. Н.А.Исакова, И.Н.Алиева, Н.М.Годжаев, *Вестник БГУ (серия ф.- м.)*, **4** (2002) 57.
23. Н.А.Исакова, И.Н.Алиева, Н.М.Годжаев, *Ж. Бильги*, **2** (2003) 20.

## NEYROMEDİN U-8-İN QLİSİNLƏ MONOƏVƏZEDİLMİŞ ANALOQLARININ KONFORMASIYA HALLARI

N.Ə. İSAKOVA, İ. N. ƏLİYEVƏ, N.M. QOCAYEV

Neyromedin U-8-in birinci quruluşunda amin turşularının nöqtəvi əvəz edilməsinin təbii neyromedinin konformasiya sabilliyinə təsiri öyrənilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, peptid zəncirində 2-ci yerdə duran aromatik amino turşusunun qlisinlə əvəz edilməsi nəticəsində neuropeptidin aktivliyi zəifləmiş, Arg<sup>5</sup> –in yan zəncirinin guanidin qrupu isə neyromedinin və onun analoqlarının reseptor tərəfindən tanınması üçün vacibdir.

## CONFORMATIONAL STATES OF THE NEUROMEDİN NmU-8 ANALOGS MONO-SUBSTITUTED WITH GLYCINE

N.A.ISAKOVA, I.N.ALIEVA, N.M.GODJAEV

The effect of the amino acid point mutations on the conformational stability of the neuromedin NmU-8 has been studied by the method of theoretical conformational analysis. It was established that aromaticity of amino acid at position 2 resulted in a marked decrease of the neuropeptide contractile activity, and Arg<sup>5</sup> guanidino group of the side chain is strictly recognized by NmU-8 receptors.

Редактор: А.Гарибов