

## КОНФОРМАЦИОННОЕ ПОВЕДЕНИЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА VAL-GLU-PRO-ILE-PRO-TYR

Агаева Г.А.<sup>1,2</sup>, Гасымова У.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Бакинский государственный университет  
ул. З.Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: gulshen@mail.ru

<sup>2</sup>Бакинский инженерный университет  
Сумгаитское шоссе, 16 км, г. Баку, AZ-0101, Азербайджан

Поступила в редакцию: 30.06.2018

**Аннотация.** Методом теоретического конформационного анализа были исследованы конформационные особенности иммуностимулирующего гексапептида Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, выделенного путем ферментативного расщепления из молекулы казеина человека. В результате расчетов были определены стабильные структуры молекулы в виде ограниченного набора низкоэнергетических конформаций. Было показано, что для этой молекулы энергетически наиболее предпочтительными оказались конформации, характеризующиеся компактно свернутой формой пептидного остова. Были определены величины двугранных углов основной и боковых цепей и оценены энергетические вклады внутри и межостаточных взаимодействий во всех оптимальных конформациях гексапептида. Сопоставление геометрических и энергетических параметров стабильных структур гексапептида позволило выявить конформационно подвижные и консервативные участки молекулы.

**Ключевые слова:** иммуностимулирующий гексапептид, фагоцитоз, конформация, теоретический конформационный анализ, подвижность.

Иммуностимулирующий гексапептид, соответствующий аминокислотной последовательности (59-64) молекулы казеина человека, Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, был впервые выделен путем ферментативного расщепления [1, 2]. После очистки, синтеза и биологического тестирования было показано, что этот гексапептид стимулирует фагоцитоз опсонизированных эритроцитов с помощью мышиных перитонеальных макрофагов. Внутривенное введение пептида взрослым мышам способствовало повышению сопротивляемости инфекции *Klebsiella pneumoniae*. Было также показано, что данный гексапептид способствует выделению оксида азота из нейтрофилов [3]. В свою очередь высокие концентрации оксида азота, которые возникают при этом процессе, вызывают цитотоксическое, антибактериальное, противовирусное, противогрибковое действие, а также активируют воспалительный процесс. Показано, что NO, вступая в реакцию с железо- и тиолсодержащими участками ферментов митохондриального дыхания, репликации ДНК инфекционных агентов, проявляет прямое бактерицидное действие. Он ингибирует многие вирусные протеиназы и факторы транскрипции, необходимые для вирусной репликации, а также усиливает противовирусный эффект интерферона- $\gamma$ . Для изучения структурно-функциональных взаимосвязей молекулы иммуностимулирующего гексапептида, знание ее конформационного поведения в различных средах совершенно необходимо для определения механизма взаимодействия с одним типом различных рецепторов. С этой целью было проведено исследование пространственного строения молекулы гексапептида методом теоретического конформационного анализа на основе поэтапного фрагментарного подхода. На первом этапе исследования были исследованы конформационные особенности двух перекрывающихся по остатку изолейцина фрагментов – N-концевого тетрапептида и C-концевого трипептида. При расчете стабильных конформационных состояний гексапептида и его фрагментов учитывались невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионные вклады. Полярность среды была учтена путем введения определенной величины диэлектрической постоянной растворителя ( $\epsilon = 10$ ). Для учета среды, имитирующей мембранное окружение величина диэлектрической проницаемости бралась равной 4, а энергия водородных связей и электростатических взаимодействий оценивались в полной мере. Длины связей и валентные углы пептидной группы и боковых цепей, а также торсионные потенциалы и величины барьеров вращения соответствуют значениям, предложенным Момани и др [4]. При обсуждении результатов расчета была использована принятая классификация пептидных структур [5]. Конформационное состояние каждого остатка определялось значениями двугранных углов  $\phi$ ,  $\psi$  и  $\omega$  основной цепи и  $\chi^i$ , боковых цепей. Углы  $\phi$  и  $\psi$  основной цепи в конформациях находятся в низкоэнергетических областях стерической карты: R ( $\phi, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$ ), B ( $\phi = -180^\circ \div 0^\circ, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$ ), L ( $\phi, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$ ) и P ( $\phi = 0^\circ \div 180^\circ, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$ ). Введено понятие формы остатка, которое характеризует область (R, B, L или P) значений углов  $\phi$  и  $\psi$ . Выбор структурных вариантов при расчете конформаций отдельных пептидов и их фрагментов осуществлялся на основе известных значений двугранных углов ( $\phi$  и  $\psi$ ) соответствующих низкоэнергетическим областям конформационной карты R, B и L для каждого монопептида. 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, LP и PP).

**Таблица 1.** Величины энергетических вкладов различных типов взаимодействий в оптимальных конформациях молекулы тетрапептида H-Val-Glu-Pro-Ile-C<sup>α</sup>

N	Конформация	Шейп	Энергетический вклад различных типов взаимодействий атомов в потенциальную энергию тетрапептида (ккал/моль)				
			E невал.взаим	E эл.взаим	E тор	E общ	E <sub>отн.</sub>
1	R <sub>2</sub> B <sub>32</sub> B R <sub>22</sub>	fee	-13,3	3,9	1,1	-8,3	0
2	R <sub>2</sub> B <sub>32</sub> B R <sub>12</sub>		-12,3	3,8	1,6	-6,9	1,4
3	R <sub>2</sub> B <sub>22</sub> B R <sub>12</sub>		-12,6	3,8	2,5	-6,3	2
4	R <sub>3</sub> B <sub>32</sub> B R <sub>22</sub>		-10,9	3,8	1,5	-5,6	2,7
5	R <sub>2</sub> B <sub>32</sub> B R <sub>32</sub>		-9,7	4	1,1	-4,6	3,7
6	B <sub>2</sub> B <sub>32</sub> B R <sub>22</sub>	eee	-13	3,9	1,3	-7,8	0,5
7	B <sub>1</sub> B <sub>32</sub> B R <sub>22</sub>		-12,9	3,9	1,4	-7,5	0,8
8	B <sub>3</sub> B <sub>32</sub> B R <sub>22</sub>		-11,9	3,9	1,2	-6,8	1,5
9	B <sub>1</sub> B <sub>32</sub> B R <sub>12</sub>		-12,1	3,9	1,8	-6,5	1,8
10	B <sub>2</sub> B <sub>32</sub> B R <sub>12</sub>		-12	3,7	1,8	-6,5	1,8
11	R <sub>2</sub> B <sub>12</sub> R R <sub>22</sub>	fef	-10,9	5,3	1,3	-4,4	3,9
12	R <sub>2</sub> B <sub>32</sub> R R <sub>22</sub>		-10	4,6	1,1	-4,4	3,9
13	R <sub>2</sub> B <sub>22</sub> R R <sub>22</sub>		-10	5,1	1,1	-3,7	4,6
14	R <sub>2</sub> B <sub>32</sub> R R <sub>12</sub>		-8,6	4,6	1,5	-2,5	5,8
15	R <sub>2</sub> B <sub>12</sub> R R <sub>12</sub>		-9,4	5,3	1,9	-2,3	6
16	B <sub>2</sub> B <sub>32</sub> R R <sub>22</sub>	eef	-10	4,5	1,2	-4,3	4
17	B <sub>1</sub> B <sub>32</sub> R R <sub>22</sub>		-9,8	4,6	1,2	-4	4,3
18	B <sub>2</sub> B <sub>12</sub> R R <sub>22</sub>		-10,2	5	1,4	-3,8	4,5
19	B <sub>3</sub> B <sub>32</sub> R R <sub>22</sub>		-9,4	4,5	1,4	-3,8	4,5
20	B <sub>2</sub> B <sub>22</sub> R R <sub>22</sub>		-10,1	5,1	1,3	-3,8	4,5

Нумерация при форме цепи означает ориентацию боковой цепи: 1-60°, 2-180° и 3-(-60°). Отсчет двугранных углов вращения  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  и  $\chi^1$  проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB [6]. Поиск минимумов потенциальной энергии осуществлялся методом сопряженных градиентов [1, 7]. Геометрия аминокислот и система идентификаторов конформаций были взяты из работы [8].

Результаты конформационного исследования показали, что N-концевая тетрапептидная последовательность пептида является относительно подвижным участком и способным образовывать различные бета- и гамма-изгибы, благодаря наличию в цепи остатка пролина. В таблице 1 приведены величины энергетических вкладов различных типов взаимодействий в оптимальных конформациях молекулы тетрапептида Val-Glu-Pro-Ile.

Исследование конформационных особенностей биологически активного C-концевого трипептида: Ile-Pro-Tyr проводилось на основе стабильных конформаций соответствующих монопептидов. Расчет показал, что для C-концевого трипептида энергетически предпочтительными оказались изгибные формы. Иными словами наличие остатка пролина, своеобразие циклического строения основной цепи которого приводит к изгибу цепи стабильных структур каждого фрагмента молекулы.

**Таблица 2.** Величины энергетических вкладов различных типов взаимодействий в оптимальных конформациях молекулы трипептида H-Ile-Pro-Tyr-OH

N	Конформация	Шейп	Энергетический вклад различных типов взаимодействий атомов в потенциальную энергию трипептида (ккал/моль)				
			E невал.вз	E эл.взаим	E тор	E общ	E <sub>относит</sub>
1	B <sub>32</sub> R B <sub>12</sub>	ef	-9,3	-1	1,8	-8,5	0
2	B <sub>32</sub> R R <sub>32</sub>		-8	-1,9	1,6	-8,3	0,2
3	B <sub>12</sub> R B <sub>12</sub>		-9,6	-1,1	2,5	-8,1	0,4
4	B <sub>12</sub> R R <sub>32</sub>		-8,3	-1,7	2,6	-7,5	1
5	B <sub>32</sub> B R <sub>32</sub>	ee	-7,2	-1,3	1,8	-6,7	1,8
6	B <sub>12</sub> B R <sub>12</sub>		-6,6	-1,1	1,7	-6,1	2,4
7	B <sub>12</sub> B B <sub>32</sub>		-7,9	-0,7	2,7	-5,9	2,6
8	B <sub>32</sub> B B <sub>12</sub>		-6,4	-0,8	1,8	-5,4	3,1

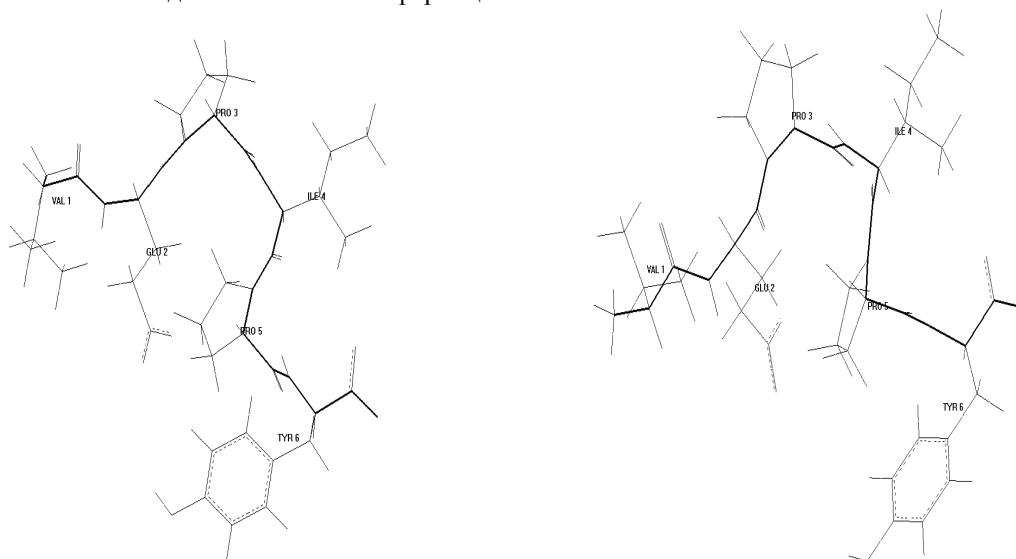
**Таблица 3.** Двугранные углы (град) аминокислотных остатков молекулы гексапептида Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr в двух энергетически предпочтительных конформациях I - ( $E_{\text{отн}} = 0,0$  ккал/моль), II - ( $E_{\text{отн}} = 2,8$  ккал/моль)

Остаток	Конформация	Основная цепь			Боковая цепь			
		$\varphi$	$\psi$	$\omega$	$\chi_1$	$\chi_2$	$\chi_3$	$\chi_4$
Val <sup>1</sup>	I	-113	-65	182	179	181	179	-
	II	-116	135	180	179	181	179	-
Glu <sup>2</sup>	I	-96	148	168	-60	180	88	-
	II	-63	150	173	-63	180	89	-
Pro <sup>3</sup>	I	-60	-60	169	-	-	-	-
	II	-60	-50	179	-	-	-	-
Ile <sup>4</sup>	I	-128	94	175	-57	185	173	188
	II	-91	124	177	-58	188	171	186
Pro <sup>5</sup>	I	-60	-47	185	-	-	-	-
	II	-60	146	171	-	-	-	-
Tyr <sup>6</sup>	I	-103	165	180	-54	90	180	-
	II	-140	-39	180	-64	99	180	-

В таблице 2 приведены величины энергетических вкладов различных типов взаимодействий в оптимальных конформациях молекулы трипептида Н-Ile-Pro-Tyr-ОН. Низкоэнергетические конформации пептидов отличаются в основном энергией дисперсионных взаимодействий, т.е. в конечном счете, плотностью упаковки.

На втором этапе на основе стабильных конформаций тетрапептидного и трипептидного фрагментов были составлены и рассчитаны конформации для целого гексапептида. Практически самые низкоэнергетические конформации гексапептида отличаются друг от друга относительной стабильностью С-концевого трипептидного участка фрагмента. Расчет конформаций гексапептида позволяет сделать заключение, что эта молекула обладает заметной конформационной ограниченностью. Результаты конформационного анализа всей молекулы гексапептида выявили ограниченный набор его низкоэнергетических структур.

Как оказалось в свободном состоянии оптимальные конформации молекулы пептида отдают предпочтение формированию стабильного изгиба на участке Pro-Ile последовательности. Определение оптимальной конформационной динамики молекулы проводилось в поле стабильных конформационных состояний природной молекулы, что позволяет более конкретно оценить конформационные изменения при вариации ориентации отдельных боковых цепей. Проведенное теоретическое исследование конформационных особенностей иммуностимулирующего гексапептида выявило конформационные аспекты их энергетической стабильности. По видимому, в зависимости от того в какой ориентации находится боковая цепь остатка в низкоэнергетической структуре могут стабилизироваться или дестабилизироваться предпочтительные межостаточные взаимодействия в этих конформациях.



**Рисунок 1.** Проекция двух родственных конформационных состояний молекулы иммуностимулирующего гексапептида, построенных на величинах двугранных углов соответствующих структур (табл. 3)

В таблице 3 приведены геометрические параметры- величины двугранных углов основной и боковых цепей- двух энергетически наиболее предпочтительных структур молекулы иммуностимулирующего гексапептида. На рисунке приведены проекции двух родственных конформационных состояний молекулы иммуностимулирующего гексапептида, построенных на величинах двугранных углов соответствующих структур (табл. 3). Данное исследование выявило степень конформационной подвижности молекулы гексапептида.

Как видно в результате расчетов были определены похожие энергетически предпочтительные области величин двугранных углов и одинаковое взаимное расположение остатков в низкоэнергетических конформациях гексапептида. Проведённое исследование показало, что иммуностимулирующий гексапептид в условиях полярной среды не реализует одно единственное пространственное строение, а формирует ограниченный набор низкоэнергетических конформаций с относительно жёстким С-концевым трипептидом и лабильным N-концом. Как показали расчеты в условиях, имитирующих мембранное окружение, возникает заметная дифференциация с еще большим энергетическим разрывом в пользу полусвернутой конформации гексапептида.

#### **Список литературы / References:**

1. Parker F., Migliore-samour D., Floc'h F., Zerial A., Werner G.H., Jollles J., Casaretto M., Zahn H., Jolles P., Immunostimulating hexapeptide from human casein :amino acid sequence, synthesis and biological properties. *Eur. J. Biochem.*, 1984, vol. 45, pp. 677-682.
2. Jaziri M., Migliore-Samour D., Casabianca-Pignède M.-R., Keddad K., Morgat J.K., Jollès P. Specific binding sites on human phagocytic blood cells for Gly-Leu-Phe and Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, immunostimulating peptides from human milk proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1992, vol. 1160, iss. 3, pp. 251-261
3. Rysz J., Redliński A., Mudyna J., Lucia M. Synthesis and immunomodulatory activity of novel analogues of human beta-casein fragment [54-59]. *Acta pol pharm.*, 2000, vol. 57, pp. 11-14.
4. Momany F., McGuire R., Burgess A., Scheraga H. Energy parameters in polypeptides. Geometric parameters, partial atomic charges, non bonded interaction for naturally occurring amino acid. *J. Phys. Chem.*, 1975, vol. 79, pp. 2361-2381.
5. Popov E.M. Quantative approach to conformations. *Int. J. Quantum Chem.*, 1979, vol. 16, pp. 707-737.
6. *IUPAC-IUB Quantity. Units and Symbols in Physical Chemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1988, vol. 39, 233 p.
7. Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godjaev N.M The program for semiempirical calculation of conformations of the molecular complexes. *Russ. J. Struct. Khim.*, 1983, vol. 24, pp. 147-148.
8. Agaeva G.A., Agaeva U.T., Godjaev N.M The spatial organization of human hemokinin-1 and mouse/rat hemokinin-1 molecules. *Russ. Biophysics*, 2015, vol. 60, pp. 365-377.

### **CONFORMATIONAL BEHAVIOR OF IMMUNOSTIMULATING PEPTIDE**

#### **VAL-GLU-PRO-ILE-PRO-TYR**

**Agaeva G.A.<sup>1,2</sup>, Qasimova H.B.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Baku State University

Z. Khalilov str., 33, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: gulshen@mail.ru

<sup>2</sup>Baku Engineering University

Sumqait Road, 16 km, AZ-0101, Baku, Azerbaijan

**Abstract.** By theoretical conformational analysis method have been investigated the conformational properties of immunostimulating hexapeptide, obtained from human casein by enzymatic digestion. Conformational analysis indicate that the spatial structure of hexapeptide can be described by set of low-energy conformations. It is shown that immunostimulating hexapeptide forms energetically favoured conformations with compact folded shapes of backbone. Calculations produced the values of all dihedral angles of the backbones and side chains and also intra- and inter-residue interactions energy contributions at the preferred conformations of hexapeptide. The comparison of the geometric and energetic parameters of stable conformations of hexapeptide permit to determine the conformational flexible and conservative segments of molecule.

**Key words:** immunostimulating hexapeptide, phagocytosis conformation, theoretical conformational analysis, flexibility.