

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ МОЛЕКУЛЫ ГИЛАМБАТИНА

Агаева Г.А., Сафарли Г.Р., Годжаев Н.М.

Бакинский государственный университет

ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: gulshen@mail.ru

Поступила в редакцию 16.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0502

**Аннотация.** Методами молекулярной механики и молекулярной динамики были исследованы особенности пространственной организации молекулы гиламбатина. Гиламбатин состоит из двенадцати аминокислотных остатков в последовательности: Asp-Pro-Pro-Asp-Pro-Asn-Arg-Phe-Tyr-Gly-Met-Met-NH<sub>2</sub>. В отличие от всех других тахикининов, гиламбатин имеет остаток Met, заменяющий обычный Leu в предпоследнем положении. Тахикининовый пептид гиламбатин был выделен и химически охарактеризован из метанольных экстрактов кожи *Hylambates maculatus*, африканской лягушки-ракофориды. Было показано, что вводимый внутривенно гиламбатин значительно повышает уровень глюкозы и инсулина в плазме крови. В данной работе было проведено исследование конформационной подвижности молекулы гиламбатина методами молекулярной механики и молекулярной динамики. При конформационном расчете пептида учитывали невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионные потенциалы. На основе фрагментарного анализа были определены стабильные пространственные структуры додекапептида гиламбатина, которые могут быть представлены в виде набора конформаций, характеризующихся относительно лабильным N-концевым тетрапептидом и конформационно жестким C-концевым октапептидом. В рассчитанных стабильных конформационных состояниях были уточнены и энергетически оценены эффективные взаимодействия боковых цепей остатков и водородные связи. Показано, что молекула гиламбатина предпочитительно формирует практически изоэнергетичные конформации с различными структурными типами на N-конце пептидной цепи, переходящими в виток альфа-спирали на C-конце [2]. Методом молекулярной динамики была смоделирована картина внутримолекулярной подвижности стабильных конформаций молекулы гиламбатина как в вакууме, так и в окружении молекул воды. На основе рассчитанных значений двугранных углов были построены молекулярные модели энергетически предпочтительных конформационных состояний додекапептида гиламбатина.

**Ключевые слова:** гиламбатин, тахикинин, конформация, молекулярная механика, молекулярная динамика.

### ВВЕДЕНИЕ

Гиламбатин является единственным нейропептидом из семейства тахикининов, который имеет остаток метионилметионина на C-конце, а не C-концевой трипептид -Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, который до сих пор был характерным признаком всех членов семейства тахикининов. Гиламбатин состоит из двенадцати аминокислотных остатков в последовательности DPPDPNRFYGMМамид. Гиламбатин был выделен и химически охарактеризован из метанольных экстрактов кожи африканской ракофоридной лягушки *Hylambares macufaru*. Влияние гиламбатина на секрецию глюкорегуляторных гормонов исследовали на крысах. Гиламбатин, вводимый внутривенно в дозированных дозах за 10 и 30 минут до забора крови, значительно повышал как уровень глюкозы в плазме, так и уровень инсулина в плазме, в то время как секреция глюкагона не влияла [1]. Это свойство гиламбатина отличается от свойств других тахикининов- кассина или вещества Р. Поскольку гиламбатин, как и другие нейропептиды, присутствует в тканях млекопитающих, он может играть роль в регуляции углеводного обмена. Установлено, что тахикинины в той или иной мере могут взаимодействовать с тремя различными типами тахикининовых рецепторов NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> и NK<sub>3</sub>, но предпочтительно взаимодействуют с NK<sub>1</sub> рецептором. Разные типы рецепторов могут присутствовать в одной и той же ткани, но в разных пропорциях. Обладая значительным структурным сходством участков связывания рецепторов, они легко могут активироваться разными тахикининовыми пептидами, одинаковая C-концевая последовательность которых определяет одинаковую активную пространственную структуру и позволяет объяснить отсутствие строгой специфичности во взаимодействии тахикининов с рецепторами. Сопоставление первичных структур известных тахикининов сразу выделяет похожую консервативную C-концевую и различающиеся N-концевые части этих молекул. Научный интерес к тахикининам, несомненно, обусловлен прежде всего широким спектром их биологических свойств. Большая конформационная подвижность пептидов приводит к существованию в растворе набора конформеров, из которых трудно выделить биологически активный. Однако, поиск циклических и конформационно-ограниченных аналогов, без знания полного набора стабильных конформеров природной молекулы таит в себе определённые недостатки. К недостаткам такого подхода относят трудность подбора жесткого аналога и возможные изменения его спектра действия по сравнению с природным пептидом. Кроме того, при конструировании таких аналогов не учитываются конформационные факторы стабильности

структур: структурообразующая роль отдельных остатков, важность внутримолекулярных межостаточных взаимодействий и ориентация боковых цепей отдельных остатков. Поэтому, целесообразно использование методов молекулярного моделирования для определения всех стабильных конформаций пептидных биорегуляторов и выявления их конформационной подвижности.

### МЕТОД РАСЧЕТА

Исследование пространственного строения молекулы гиламбатина проводилось методом молекулярной механики с использованием стандартной геометрии. При конформационном расчете пептидов учитывали невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионные потенциалы. Расчет проводился согласно фрагментарному анализу молекулы. Используемая в данном исследовании классификация пептидных структур, и потенциальные функции расчетной схемы полуэмпирического конформационного анализа и их параметризация описана в работах [3-5]. При обсуждении результатов расчета была использована принятая классификация пептидных структур [6]. Конформационное состояние каждого остатка определялось значениями двугранных углов  $\varphi$ ,  $\psi$  и  $\omega$  основной цепи и  $\chi^i$ , боковых цепей. Углы  $\varphi$  и  $\psi$  основной цепи в конформациях находятся в низкоэнергетических областях стерической карты: R ( $\varphi, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$ ), V ( $\varphi = -180^\circ \div 0^\circ, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$ ), L ( $\varphi, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$ ) и P ( $\varphi = 0^\circ \div 180^\circ, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$ ). Введено понятие формы остатка, которое характеризует область (R, V, L или P) значений углов  $\varphi$  и  $\psi$ . Поиск минимумов потенциальной энергии осуществлялся методом сопряженных градиентов, описанной и примененной в работах [6,7]. Расчет стабильных конформаций молекулы проводился с помощью программы [8]. Расчет двугранных углов вращения  $\varphi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  и  $\chi^i$  проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB [9].

Метод молекулярной динамики, основанный на компьютерном решении уравнения движения Ньютона, позволяет проследить конформационное поведение молекулы во времени. Достаточно широкие диапазоны этого метода позволяют обратиться к исследованию от небольших пептидных молекул до белков, в вакууме и в присутствии растворителя [10,11]. Молекулярная динамика молекул проводилась в следующей последовательности:

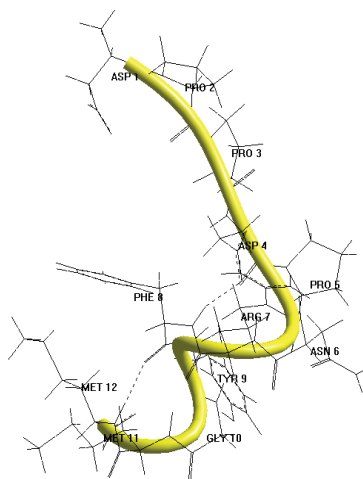
1. Ввод начальных данных;
2. Минимизация энергии;
3. Нагрев до 300K;
4. Равновесные симуляции и
5. Молекулярное моделирование.

Молекулярная динамика моделирования была выполнена для молекулы гиламбатина в вакууме, а также в среде, имитирующей водное окружение с использованием объема с молекулами воды [11].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Согласно результатам расчета стабильных конформаций додекапептид гиламбатина обладает заметной конформационной подвижностью [12]. В наборе низкоэнергетических конформаций доминирующей структурами являются структуры, реализующие небольшой  $\alpha$ -спиральный сегмент на C-концевом фрагменте. Предполагая, что именно эти структуры являются физиологически активными конформационными состояниями молекулы гиламбатина, можно определить, как изменяются исходные величины двугранных углов предпочтительных конформаций, выбранные из результатов теоретического конформационного анализа, в различных средах в зависимости от времени и температуры. Для этой цели нами были выбраны энергетически самые предпочтительные конформации с  $\alpha$ -спиральным сегментом на C-концевом фрагменте.

На первом этапе молекулярного исследования конформационной подвижности молекулы гиламбатина была проведена симуляция динамики в условиях вакуума. Пошаговым изменением температуры на 5 K были определены средние значения кинетической и полной энергий молекулярной системы. Процесс симуляции проводился во временном интервале 7 нс с шагом 0,001 нс. Следует отметить, что процесс нагревания и релаксации составил 1 нс, процесс охлаждения составил 5 нс. Оптимизированная структура молекулы гиламбатина в условиях вакуума показана на рисунке 1. На следующем этапе молекулярно-динамическое моделирование для молекул в конформации с минимальным значением полной энергии проводилось в гипотетическом кубическом объеме, содержащем 476 молекул воды с наложенными периодическими граничными условиями. Размер ящика с водой подбирался в соответствии с размерами исследуемой молекулы. Согласно результатам проведенного расчета фрагмент 5-12 сохраняет свернутый характер пептидной цепи до и после оптимизации и водородные связи между CO и NH-группами пептидной цепи не разрушаются в процессе молекулярной динамики, несмотря на изменения во внутримолекулярной энергии нейропептида на 10-15 ккал/моль. Заметная конформационная подвижность наблюдается в ориентации боковых цепей остатков аспарагиновой кислоты, расположенных в N-концевой части молекулы, характерные амплитуды движений этих групп составляют порядка ангстрема, а времена релаксации – порядка наносекунд. На рисунке 2 приведена оптимизированная структура гиламбатина в водном окружении. Допустимые изменения величин двугранных углов внутреннего вращения энергетически самой предпочтительной конформации молекулы гиламбатина при моделировании MD в вакууме и водном окружении представлены в таблице. Устойчивость структуры отдельных фрагментов подтверждают также значения двугранных углов в основной цепи молекулы, пределы изменения



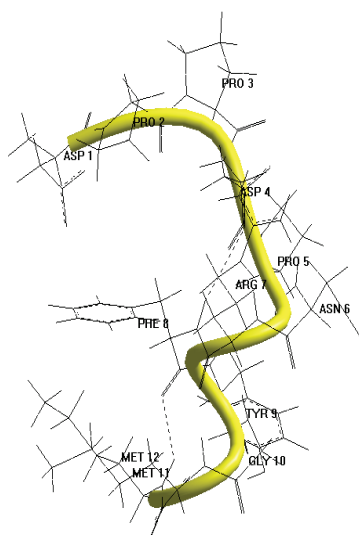
**Рисунок 1.** Оптимизированная структура молекулы гиламбатина в условиях вакуума. Желтой линией указана вторичная структура

которых приведены в таблице.

При симуляции как в вакууме, так и в водной среде в глобальной конформации гиламбатина имеют место заметные флуктуации остатков, главным образом, в N-концевой части молекулы. Это, прежде всего варьирование угла  $\psi$  остатка Pro<sup>3</sup>, который изменяется вплоть до перехода из В области в R область конформационного пространства и тем самым меняется конформационное состояние Pro<sup>3</sup> в поле исходной конформации.

**Таблица 1.** Допустимые изменения величин (в градусах) двугранных углов энергетически самой предпочтительной конформации молекулы гиламбатина при моделировании MD в вакууме (верхняя строка) и водном окружении (нижняя строка)

Остаток	Углы основной цепи до и после оптимизации			Углы боковых цепей до и после оптимизации			
	$\phi$	$\psi$	$\omega$	$\chi_1$	$\chi_2$	$\chi_3$	$\chi_4$
Asp <sup>1</sup>	-66 → -70	137 → 140	177 → 175	185 → 196	94 (+2)		
	-66 → -76	137 → 138	177 → 178	185 → 194	94 (+2)		
Pro <sup>2</sup>	-60 → -60	152 → 160	168 → 176				
	-60 → -60	152 → 149	168 → 188				
Pro <sup>3</sup>	-60 → -60	146 → -55	182 → 184				
	-60 → -60	146 → -66	182 → 187				
Asp <sup>4</sup>	-124 → -125	122 → 145	187 → 192	186 → 196	92 (+2)		
	-124 → -126	122 → 155	187 → 198	186 → 192	92 (+2)		
Pro <sup>5</sup>	-60 → -60	-44 → -50	198 → 173				
	-60 → -60	-44 → -70	198 → 183				
Asn <sup>6</sup>	-84 → -87	-53 → -55	193 → 169	183 → 173	88 (+2)		
	-84 → -86	-53 → -54	193 → -170	183 → 179	88 (-2)		
Arg <sup>7</sup>	-101 → -108	-56 → -58	-174 → -178	-56 → -58	183-190		
	-101 → -107	-56 → -54	-174 → -184	-56 → -78	182-194		
Phe <sup>8</sup>	-64 → -71	-48 → -36	181 → 184	-180 → -168	91-99		
	-64 → -70	-48 → -52	181 → 188	-180 → -167	91-89		
Tyr <sup>9</sup>	-74 → -60	-30 → -44	-183 → -179				
	-74 → -59	-30 → -54	-183 → -178				
Gly <sup>10</sup>	-62 → -62	-38 → -44	-177 → -175				
	-62 → -61	-38 → -45	-177 → -179				
Met <sup>11</sup>	-82 → -94	-55 → -52	-177 → -181	-59 → -59	180	180	180
	-82 → -92	-55 → -52	-177 → -181	-59 → -56	180	181	180
Met <sup>12</sup>	-86 → -92	-54 → -55	179 → 181	-59 → -59	180	180	180
	-86 → -95	-54 → -55	179 → 181	-59 → -56	180	181	180



**Рисунок 2.** Оптимизированная структура молекулы гиламбатина в условиях явно заданного водного окружения. Желтой линией указана вторичная структура

Следует отметить, такая тенденция к изменению конформационного состояния остатка Pro<sup>3</sup> в пределах глобальной конформации молекулы наблюдалась и в результатах теоретического конформационного анализа, т.е. были получены несколько сравнимых по стабильности конформаций, различающихся лишь конформационным состоянием остатка Pro<sup>3</sup>. При симуляции в водном окружении наблюдается также некоторое варьирование боковых углов остатка Asp<sup>4</sup>, что подтверждает конформационную подвижность этого остатка, несмотря на заряженность его бокового радикала. Следует отметить, что такая подвижность Asp<sup>4</sup> не чревата потерями в межостаточных взаимодействиях, поскольку имея развернутый в сторону от молекулы отрицательно заряженный радикал Asp<sup>4</sup> способен взаимодействовать с молекулами воды.

Данное моделирование конформационной подвижности молекулы позволяет заключить, что нейропептид гиламбатин содержит устойчивые элементы пространственной структуры, которые могут быть ответственны за формирование конформаций, необходимых для связывания с рецепторами тахикининов. Полученные результаты могут быть полезны при исследовании механизма действия гиламбатина и создании новых, более эффективных аналогов нейропептидов тахикининового семейства.

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

1. Gullner H.G., Harris V., Yajima H., Unger R.H., Hylambatin, a structurally unique tachykinin: effects on insulin and glucagon secretion. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1984, vol. 272, no. 2, pp. 304-309.
2. Scheraga H.A. Recent progress in the theoretical treatment of protein folding. *Biopolymers.*, 1983, vol. 22, pp.1-14.
3. Nemethy G., Pottle M.S., Scheraga H.A. Energy parameters in polypeptides. 9. Updating of geometrical parameters, nonbonded interactions, and hydrogen bond interactions for the naturally occurring amino acids. *J. Phys.Chem.*, 1983, vol. 87, pp. 1883-1887.
4. Momany F.A., Mc.Guire R.F., Burgess A.W., Scheraga H.A. Energy parameters in polypeptides: VII. Geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interaction for naturally occurring amino acid. *Phys. Chem.*, 1975, vol. 79, pp. 2361-2381.
5. Popov E.M. Quantitative approach to conformations of proteins. *Int. J. Quant. Chem.*, 1979, vol. 16, pp. 707-737.
6. Agaeva G.A., Kerimli N.N., Godjaev N.M. Structure-function organization of neurokinin A and neurokinin B molecules I. Theoretical conformational analysis of neurokinin A. *Biofizika*, 2005, vol. 50, no. 2, pp. 203-214.
7. Agaeva G.A., Kerimli N.N., Godjaev N.M. Structure-function organization of neurokinin A and neurokinin B molecules II. Theoretical conformational analysis of neurokinin B. *Biofizika*, 2005, vol. 50, no. 3, pp. 404-412
8. Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godjaev N.M. The program for semiempirical calculation of conformations of the molecular complexes. *J. Struct. Khim.*, 1983, vol. 24, no. 4, pp. 147-148.
9. Commission on Biochemical Nomenclature Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains. *Pure Appl. Chem.*, 1974, vol. 40, pp. 291-308.
10. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M. et al. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, pp. 5179-5188.
11. McCammon J.A., Harvey S.C., Dynamics of Proteins and Nucleic Acids. *Cambridge Univ. Press*, New York, 1987.
12. Агаева Г.А., Сафарли Г.Р., Годжаев Н.М. Конформационное поведение молекулы гиламбатина и его фрагмента (5-12). *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 1, с. 20-25. [Agaeva G.A.,

Safarli G.R., Godzhaev N.M. Konformacionnoe povedenie molekuly hylambatina i ego fragmenta (5-12). *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 1, pp. 20-25. (In Russ.)]

## MOLECULAR MODELLING OF CONFORMATIONAL FLEXIBILITY OF HYLAMBATIN MOLECULE

Agayeva G.A., Safarli G.R., Godjaev N.M.

Baku State University

Z. Khalilov str., 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: gulshen@mail.ru

Received 16.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpbc.2022.0502

**Abstract.** The features of the spatial organization of the hylambatin molecule were investigated by methods of molecular mechanics and molecular dynamics. Hylambatin consists of twelve amino acid residues in the sequence: Asp-Pro-Pro-Asp-Pro-Asn-Arg-Phe-Tyr-Gly-Met-Met-NH<sub>2</sub>. Unlike all other tachykinins, hylambatin has a Met residue replacing the usual Leu at penultimate position. The tachykinin peptide hylambatin has been isolated and chemically characterized from methanol extracts of the skin of *Hylambates maculatus*, an African rhacophorid frog. It has been shown that intravenously administered hylambatin significantly increases the level of glucose and insulin in blood plasma. In this paper, the conformational flexibility of the hylambatin molecule was studied by methods of molecular mechanics and molecular dynamics. The conformational calculation of the peptide took into account non-valent and electrostatic interactions, hydrogen bonds and torsion potentials. Based on fragmentary analysis, stable spatial structures of the hylambatin dodecapeptide were determined, which can be represented as a set of conformations characterized by a relatively labile N-terminal tetrapeptide and a conformationally rigid C-terminal octapeptide. In the calculated stable conformational states, the effective interactions of the side chains of residues and hydrogen bonds were refined and energetically evaluated. It has been shown that the hylambatin molecule preferably forms practically isoenergetic conformations with various structural types at the N-end of the peptide chain, passing into the alpha helix at the C-end. By the method of molecular dynamics, the pattern of intramolecular mobility of stable conformations of the hylambatin molecule was modeled both in vacuum and surrounded by water molecules. Based on the calculated values of the dihedral angles, molecular models of energetically preferred conformational states of the hylambatin dodecapeptide were constructed.

**Key words:** hylambatin, tachykinin, conformation, molecular mechanics, molecular dynamics simulation.