

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КАРДИОАКТИВНОГО НОНАПЕПТИДА

Исмаилова Л.И., Аббаслы Р.М., Ахмедов Н.А.

Бакинский государственный университет, Институт физических проблем

ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан

e-mail: Larisa_Ismailova@yahoo.com

Аннотация. С помощью метода молекулярной механики были определены пространственное строение и конформационные свойства кардиоактивной нонапептидной молекулы Pro-Phe-Cys-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gly-Cys-NH₂ (ССАР, Crustacean cardioactive peptide). Данный пептид был впервые выделен из сердечной мышцы морского краба *Carcinus maenas*, где он выполнял сократительную функцию. Молекула присутствует так же в сердце насекомых, лобстеров. Помимо сократительной функции, кардиоактивный нонапептид является переносчиком нервных импульсов в центральной нервной системе, а также относится к классу гормонов. Молекула представляет собой циклический нонапептид с первичной структурой PFCNAFTGC-NH₂ и дисульфидной связью между аминокислотными остатками Cys3 и Cys9. Потенциальная энергия этой молекулы оценивалась как сумма невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Найдены 7 низкоэнергетических конформаций для нонапептида ССАР, значения двугранных углов основной и боковых цепей, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Расчет показал, что низкоэнергетическими для нонапептида являются полусвернутые формы основной цепи, приводящие к сближенности боковых цепей цистеинов. Циклические формы сближают участки основной цепи и боковые цепи аминокислот, входящих в нонапептид, что приводит к их эффективным взаимодействиям.

Ключевые слова: нонапептид, конформация, молекула, пространственная структура

STRUCTURE-FUNCTIONAL ORGANIZATION OF THE CARDIOACTIVE NONAPEPTIDE

Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N.A.

Baku State University, Institute for Physical Problems

Z. Khalilov Str. 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan

Abstract. The spatial structure of cardioactive nonapeptide molecule Pro-Phe-Cys-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gly-Cys-NH₂ (CCAP, Crustacean cardioactive peptide) and the conformational properties were investigated using molecular mechanics method. This peptide was first isolated from the pericardial organs of the shore crab *Carcinus maenas*. It is found in crustaceans and insects where it behaves as a cardioaccelerator, neuropeptide transmitter for other areas of the nervous system and a hormone. Crustacean cardioactive peptide is highly conserved, amidated cyclic nonapeptide with the primary structure PFCNAFTGC-NH₂ and disulfide bridge between Cys3 and Cys9. The potential energy of the molecule was chosen as the sum of the non-valent, electrostatic and torsional interaction energies and the energy of hydrogen bonds. The 7 low-energy conformations of this molecule, the dihedral angles of the backbone and side chains of the amino acid residues of the tetrapeptide, and the energies of intra- and inter-residual interactions were determined. It is revealed that low energy conformations of this molecule have cyclic type of backbone. These folded forms bring parts of the backbone and the side chains of the amino acids together, and they result in convenient interactions.

Key words: nonapeptide, conformation, molecule, spatial structure

На сегодняшний день одними из самых распространенных на земле болезней по данным Всемирной Организации Здравоохранения являются заболевания сердечно-сосудистой системы. Поэтому научные исследования, связанные с изучением пространственной структуры кардиоактивных пептидов, являются актуальными. Все биохимические процессы человеческого организма контролируются собственными регуляторными пептидами. Именно такие пептидные молекулы применяются при создании новых лекарственных препаратов, поэтому определение структурно-функциональных свойств регуляторных пептидов имеет большое прикладное значение в медицине и фармакологии.

Нахождение структурно-функциональной организации позволяет определить природу регуляторных пептидов и выполняемые ими функции. Известно, что кардиоактивный пептид, состоящий из 9 аминокислотных остатков, Pro-Phe-Cys-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gly-Cys-NH₂ (ССАР), который был выделен из сердца морского краба *Carcinus maenas*, контролирует сердечную деятельность краба [1]. Выделенная кардиоактивная нонапептидная молекула ССАР вовлечена в возбуждающий контроль сердечно-сосудистой системы морского краба, а также некоторых насекомых как нейропептид и нейрогормон. Помимо сократительной функции, этот нонапептид является переносчиком нервных импульсов в центральной нервной системе, а также относится к классу гормонов. Этот кардиопептид был позже выделен и из сердечной мышцы некоторых насекомых *Manduca sexta* и *Drosophila melanogaster* [2].

Целью данной работы является изучение конформационных свойств нонапептида ССАР. Следует отметить, что важной особенностью этой молекулы является то, что она содержит два остатка цистеина Cys3 и Cys 9, которые образуют дисульфидный мостик. Образование такой дисульфидной связи обусловлено стерической предрасположенностью соответствующих участков аминокислотной последовательности к таким конформационным состояниям, в которых боковые цепи остатков цистеина оказываются сближенными, а их боковые цепи имеют необходимую для образования S-S связи взаимную ориентацию. Возникает необходимость изучения самого процесса свертывания пептидной цепи, определения низкоэнергетических конформаций

молекулы ССАР, в которых достигается согласованность стабилизирующих взаимодействий между всеми аминокислотными остатками. Выполненные ранее работы по изучению пространственной структуры апамина, тертиапина, МСД-пептида, полициклического инсектотоксина показали, что механизм спонтанной самосборки пространственной структуры пептида является детерминированным, при этом пространственно разрешенными и самыми предпочтительными становятся только взаимодействия между определенными остатками цистеина [3].

Следует отметить, что исследования физико-химических свойств молекулы ССАР указывают на то, что она имеет достаточно жесткую структуру и оказывает сильное сократительное действие на сердце краба [4]. Конформационные взаимодействия пептидных молекул являются основой современных теоретических представлений разных механизмов их функционирования. Полуэмпирический метод молекулярной механики позволяет оценить конформационные возможности пептидных молекул. Для нахождения пространственного строения молекулы ССАР использовалась разработанная нами компьютерная программа [5].

Пептидные препараты обладают низкой токсичностью и не имеют побочных эффектов. Короткие линейные пептиды не имеют в растворах фиксированной пространственной структуры. Аминокислотная последовательность и физико-химические свойства растворителя определяют набор низкоэнергетических конформаций пептидной молекулы. Известно, что могут происходить конформационные изменения пептидной цепи при взаимодействии биологически активного пептида с рецептором. Биологически активная конформация пептидной молекулы, которая реализуется при взаимодействии с рецептором, обычно входит в набор низкоэнергетических структур, существующих в водном растворе, поэтому представляет интерес исследование пространственного строения и конформационных возможностей пептидных молекул.

Для нахождения пространственного строения пептидов, нами использовался теоретический подход, позволяющий рассчитывать трехмерную структуру биомолекул исходя из известной аминокислотной последовательности [6]. Такой подход позволяет с достаточной точностью количественно описать геометрию молекулы, определить значения двугранных углов основной цепи и боковых цепей молекулы, а также энергетические взаимодействия атомов в этой молекуле. Специально введенная классификация (шейп, форма основной цепи, конформация) позволяет четко разделять рассматриваемые структуры, предполагая, что низкоэнергетическая структура биомолекулы формируется из отдельных структурных блоков меньшей длины, которые потом укладываются в пространственную структуру всей молекулы. Формы аминокислотных остатков определялись низкоэнергетическими областями В, R, L и P двугранных углов основной цепи ϕ - ψ . Отсчет двугранных углов вращения производился согласно стандартной номенклатуре IUPAC-IUB [7].

Расчет выполнялся в рамках механической модели молекул с учетом невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия оценивались по потенциалу Леннарда-Джонса с параметрами Шераги [8]. Электростатика рассчитывалась в монополярном приближении по закону Кулона с использованием зарядов, предложенных в работе [8]. Конформационные возможности пептида рассчитывались применительно к условиям водного окружения, поэтому величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Водородные связи, которые оценивались по потенциалам типа Морзе, предполагались ослабленными (максимальная энергия образования водородной связи при $r_0=1,8\text{\AA}$ составляла 1,5 ккал/моль). Торсионные потенциалы и величины барьеров вращения аналогичны величинам, предложенным в работе [8]. С помощью используемого подхода и метода теоретического конформационного анализа были найдены пространственные структуры многих пептидных молекул [9, 10].

Конформационный анализ нонапептидной молекулы Pro-Phe-Cys-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gly-Cys-NH₂ (ССАР) был разбит на несколько следующих друг за другом этапов, в каждом из которых использовались результаты предыдущего. Кардиоактивный нонапептид рассчитывался фрагментарно. Сначала были определены конформационные возможности трех тетрапептидных участков молекулы Pro-Phe-Cys-Asn, Cys-Asn-Ala-Phe и Phe-Tyr-Gly-Cys. Первый тетрапептид включал в себя 65 атомов и 18 переменных двугранных углов основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в нее. Второй тетрапептид состоял из 61 атома и 19 переменных двугранных углов. Третий тетрапептид включал в себя 95 атомов и 20 переменных двугранных углов. Каждая тетрапептидная молекула рассчитывалась исходя из знания конформационных свойств, входящих в нее монопептидов. Низкоэнергетические конформации первых двух тетрапептидов позволили оценить конформационные свойства N-концевого гексапептида Pro-Phe-Cys-Asn-Ala-Phe. На последнем этапе расчет тетрапептидного участка Phe-Tyr-Gly-Cys и гексапептидного фрагмента Pro-Phe-Cys-Asn-Ala-Phe позволили оценить конформационные возможности всего нонапептида ССАР. Присоединение С-концевого тетрапептида происходило по одной аминокислоте, то есть определялись конформационные возможности гептапептида, октапептида и, наконец, всей нонапептидной молекулы. Кардиоактивный пептид ССАР является амидом, то есть заканчивается NH₂ группой. Данная молекула включала 134 атома и 41 двугранный угол основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в нее. При расчетах для всех аминокислот учитывались В и R формы основной цепи, а для аминокислоты Gly четыре формы основной цепи В, R, L и P, а так же граничные значения углов ϕ , ψ .

Известно, что молекула ССАР содержит два аминокислотных остатка цистеина Cys3 и Cys9, которые связаны дисульфидной связью. Проведенный расчет пространственной структуры молекулы ССАР уже на тетрапептидных участках обнаружил дифференциацию конформаций. Эта дифференциация конформаций стала еще сильнее на гепта- окта- и нонапептидных фрагментах. На последнем этапе для нонапептида было рассчитано свыше 150 различных конформаций. Из них только 32 конформации попадают в энергетический интервал 0-9 ккал/моль. Среди этих конформаций только в 3 боковые цепи остатков Cys оказываются сближенными, а

расстояния между S – S атомами попадают в интервал 0-6 Å. Полученные низкоэнергетические конформации молекулы ССАР представлены в таблице 1. В ней же указаны энергетические вклады невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий, а так же относительная энергия низкоэнергетических конформаций нонапептидной молекулы.

Глобальной конформацией нонапептидной молекулы является петлеобразная свернутая форма основной цепи RB₁₁R₂₂B₁₁R₂R₃₁R₃₁₂BB₂₂. Данная конформация (E_{общ} = -29.7 ккал/моль, E_{отн} = 0.0 ккал/моль) является компактной свернутой структурой, поэтому между аминокислотными остатками молекулы возникают сильные взаимодействия. Низкая энергия этой конформации обусловлена наличием всех возможных для нонапептидной молекулы взаимодействий. Энергия невалентных взаимодействий составляет -34,1 ккал/моль, электростатических 2,0 ккал/моль, торсионных 2,5 ккал/моль. Боковые цепи остатков Cys3 и Cys9 в данной конформации оказываются сближенными, расстояние между атомами серы составляет 2,9 Å. Расчет показал, что в десяти конформациях остатки цистеинов в положениях 3 и 9 оказываются сближенными (в таблице 1 представлены 7 конформаций). В этих конформациях имеется слабое (+_ 0,2 ккал/моль), но показательное взаимодействие между остатками цистеинов. На это прямо указывают расстояния между ними (3-6 Å).

Следует отметить, что глобальная структура начала формироваться уже на гексапептидном участке молекулы ССАР, соответствующее конформационное состояние уже имело низкую энергию.

Таблица 1 – Энергетические вклады (ккал/моль) низкоэнергетических конформаций нонапептида ССАР

№	Шейп	Конформация	E _{нев}	E _{эл}	E _{тор}	E _{общ}	E _{отн}	Расстояние Cys3(S) Cys9(S)Å
1	fefefffe	RB ₁₁ R ₂₂ B ₁₁ R ₂ R ₃₁ R ₃₁₂ BB ₂₂	-34.1	2.0	2.5	-29.7	0.0	2.9
2	ffeeefff	RR ₁₁ B ₂₂ B ₃₁ B ₂ R ₃₁ R ₃₁₂ RR ₂₂	-33.7	2.7	3.0	-28.0	1.7	5.3
3	ffeefffe	RR ₁₁ B ₂₂ B ₃₁ R ₂ R ₃₁ R ₃₁₂ BB ₂₂	-31.4	3.0	2.9	-25.5	4.2	5.9
4	fffeefff	RR ₁₁ R ₂₂ B ₃₁ B ₂ R ₃₁ R ₃₁₂ RR ₂₂	-35.4	2.8	3.8	-28.7	1.0	8.3
5	eefffeff	BB ₁₁ R ₂₂ R ₃₁ R ₂ B ₁₁ B ₁₁₂ PR ₂₂	-30.0	3.2	2.8	-23.6	6.1	8.4
6	eefffeef	BB ₁₁ R ₂₂ R ₃₁ R ₂ B ₁₁ R ₁₁₂ PR ₂₂	-28.6	2.8	2.0	-23.9	5.8	14.5
7	effeeeff	BR ₂₁ R ₂₂ B ₃₁ B ₂ B ₁₁ B ₃₁₂ PR ₂₂	-27.7	2.6	4.3	-20.7	9.0	17.0

При последовательном переходе от гексапептидного участка к гепта-, октапептидным фрагментам части глобальной структуры нонапептида неизменно оказывались предпочтительными по энергии, а шейпы основной цепи были наиболее представительными по числу низкоэнергетических вариантов. Основная достройка пространственной структуры кардиоактивного нонапептида ССАР происходила без значительных изменений геометрических и энергетических параметров сложившихся на более коротких участках конформационных состояний. Таким образом, результаты конформационного анализа, полученные для молекулы ССАР, свидетельствуют о строго детерминированном механизме укладки пептидной цепи природного пептида в нативную конформацию со сближенными остатками цистеинов, образующую дисульфидную связь. Образование дисульфидной связи осуществляется согласно механизму, в основе которого лежат конформационные аспекты.

Проведенный расчет пространственной структуры молекулы Pro-Phe-Cys-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gly-Cys-NH₂ позволил определить геометрические параметры кардиоактивного нонапептида, значения двугранных углов основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в молекулу. Пространственное расположение аминокислот в низкоэнергетических конформациях RB₁₁R₂₂B₁₁R₂R₃₁R₃₁₂BB₂₂ и RR₁₁R₂₂B₃₁B₂R₃₁R₃₁₂RR₂₂ представлено на рисунках 1, 2. Следует отметить, что создание дисульфидного мостика обусловлено предрасположенностью соответствующих остатков Cys3 и Cys9 молекулы ССАР к такому образованию формы основной цепи, которое приводит к сближенности боковых цепей этих остатков. Так, в глобальной структуре RB₁₁R₂₂B₁₁R₂R₃₁R₃₁₂BB₂₂ расстояние между атомами серы составляет 2,9 Å.

На рисунке 1 видно, как близко расположены в этой конформации атомы серы, они могут вступать во взаимодействие друг с другом. Всего 1,0 ккал/моль проигрывает ей конформация RR₁₁R₂₂B₃₁B₂R₃₁R₃₁₂RR₂₂, где расстояние между атомами серы остатков цистеинов составляет 8,3 Å. На рисунке 2 видно, что остатки Cys3 и Cys9 далеко расположены друг от друга, что делает невозможным образование дисульфидной связи между атомами серы.

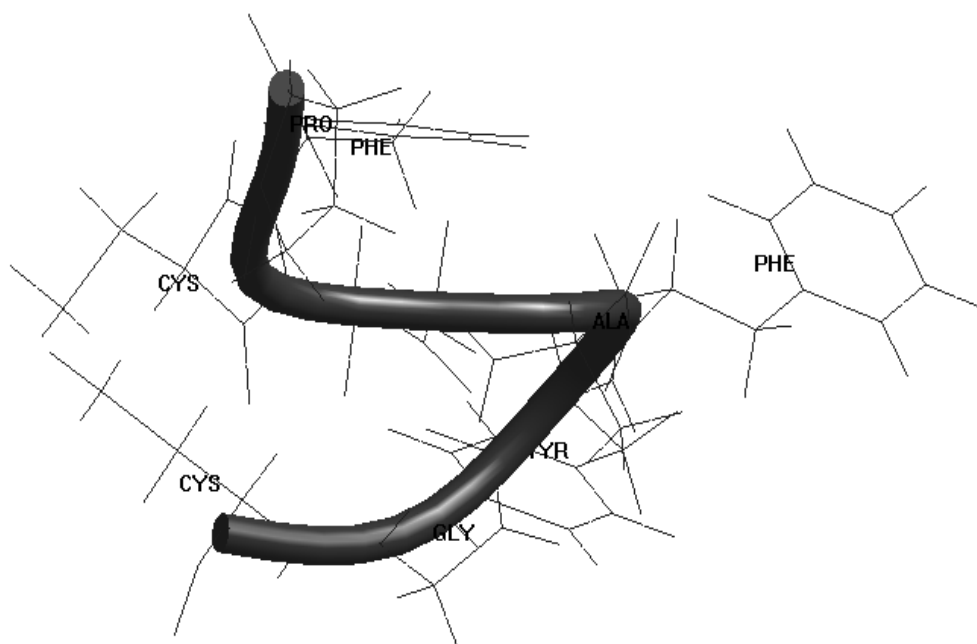


Рисунок 1 – Пространственная структура низкоэнергетической конформации RBRBRRRBV молекулы ССАР

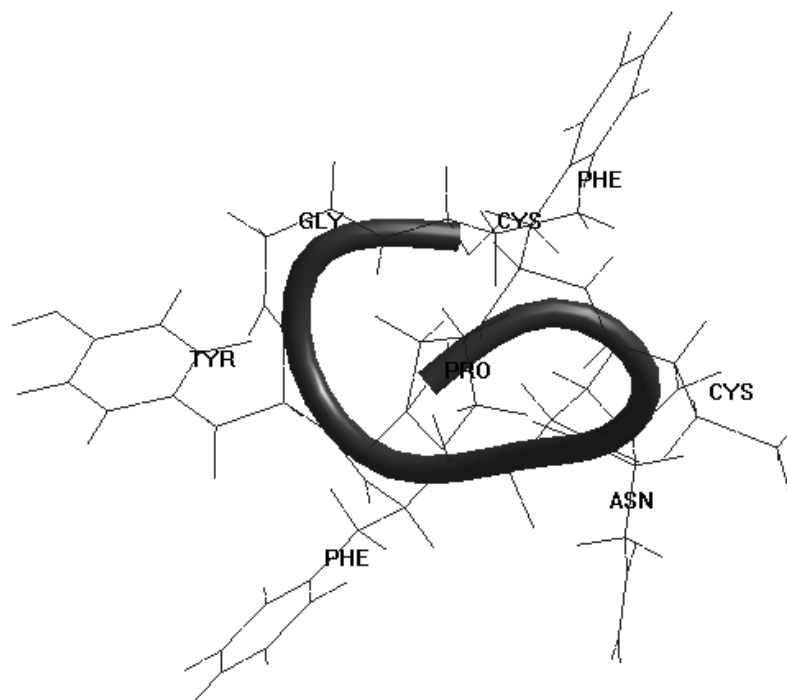


Рисунок 2 – Пространственная структура низкоэнергетической конформации RRRBBRRRR молекулы ССАР

Полученные результаты расчета пространственной структуры кардиоактивного нонапептида ССАР обнаружили возможную реализацию ряда структур. Среди них низкоэнергетическими являются структуры со сближенными остатками цистеина, боковые цепи которых сближаются на такие расстояния, когда возможно образование дисульфидной связи. Расчет показал, что среди низкоэнергетических конформаций молекулы ССАР есть и такие, которые не отвечают сближению боковых цепей цистеинов. Низкая энергия таких конформаций обусловлена внутримолекулярными взаимодействиями между аминокислотными остатками. Проведенные расчеты трехмерной структуры молекулы ССАР позволяют определить количественно геометрические и энергетические параметры нонапептида, значения двугранных углов основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в молекулу, а также энергетические вклады внутримолекулярных взаимодействий. Полученные результаты могут быть использованы для конструирования новых аналогов ССАР.

Список литературы / References:

1. Dirksen H. Conserved crustacean cardioactive peptide (CCAP) neuronal networks and functions in arthropod evolution. *Recept Advances in Arthropod Endocrinology*, Cambridge, 1998, pp. 302-333.
2. Donini A., Lange A.B. The effects of crustacean cardioactive peptide on locust oviducts are calcium-dependent. *Peptides*, 2002, vol. 23, pp. 683-691.
3. Ломизе А.Л., Попов Е.М. Теоретический конформационный анализ МСД-пептида. *Молекулярная биология*, 1983, т. 17, № 4, с. 1212-1220. [Lomize A.L., Popov E.M. Theoretical conformational analysis of the MSD-peptide. *Molecular biology*, 1983, vol. 17, no. 4, pp. 1212-1220. (In Russ.)]
4. Dulcis D., Levine R.B., Ewer J. Role of the neuropeptide CCAP in Drosophila cardiac function. *Journal of Neurology*, 2005, vol. 64, no. 3, pp. 259-274.
5. Maksimov I.S., Ismailova L.I., Godjaev N.M. A computer program for calculation of conformations of molecular systems. *J. Struc. Chem.*, 1983, vol. 24, pp. 147-148.
6. Попов Е.М. *Белки и пептиды*. М.: Наука, 1995, 73 с. [Popov E.M. *The Proteines and peptides*. Moscow, Nauka, 1995, 73 p. (In Russ.)]
7. *IUPAC-IUB, Quantity, Units and Symbols in Physical Chemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988, 39 p.
8. Momany F.A., McGuire R.F., Burgess A.W., Scheraga H.A. Energy parameters in polypeptides. VII. Geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interactions, hydrogen bond interaction and intrinsic torsional potentials for naturally occurring amino acid. *J. Phys. Chem.*, 1975, vol. 29, pp. 2361-2381.
9. Akhmedov N.A., Gadjiyeva Sh.N., Abbasli R.M. Structural organization of Asp-Pro- Lys-Gln-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ molecule. *Cur. Top. in Pept. & Prot. Res.*, 2009, vol. 10, pp. 57-62.
10. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Agayeva L.N., Gocayev N.M. The spatial structure of the cardio active peptide". *Cur. Top. in Pept. & Prot. Res.*, 2010, vol. 11, pp. 87-93.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ АНАЛОГОВ МОЛЕКУЛЫ ГЕМОКИНИНА-1 ЧЕЛОВЕКА

Агаева Г.А.

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

Аннотация. Методом молекулярной механики были исследованы конформационные свойства аналогов молекулы гемокинина-1 человека, в которых каждый из аминокислотных остатков в свою очередь был замещен глицином. В результате расчетов были определены стабильные структуры всех аналогов в виде ограниченного набора низкоэнергетических конформаций. Было показано, что для этих аналогов также как и для молекулы гемокинина-1 энергетически наиболее предпочтительными оказались конформации, характеризующиеся наличием альфа-спирального сегмента на С-конце молекулы. Были определены величины двугранных углов основной и боковых цепей и оценены энергетические вклады внутри и межостаточных взаимодействий во всех оптимальных конформациях аналогов. Сопоставление геометрических и энергетических параметров стабильных структур пептида и его аналогов позволило выявить важность каждого остатка в пространственной укладке молекулы.

Ключевые слова: гемокинин-1 человека, глицин, аналоги, конформация, теоретический конформационный анализ.

COMPARATIVE CONFORMATIONAL ANALYSIS OF HUMAN HEMOKININ-1 MOLECULE ANALOGS

Agaeva G.A.

Baku State University
Z. Khalilov St., 33, Baku, AZ-1148, Azerbaijan
e-mail: gulshen@mail.ru

Abstract. By molecular mechanics method have been investigated the conformational properties of human hemokinin-1 (hHK-1) analogs, in which each amino acid of molecule is replaced in turn by glycine. Conformational analysis indicated that the spatial structure of these analogues can be described by set of low-energy conformations. It is shown that monosubstituted analogs as well as native molecule forms energetically favored conformations with alpha helical segment at C-terminate end. Calculations produced the values of all dihedral angles of the backbones and side chains and also energy contributions of intra- and inter-residue interactions energy of preferred conformations of analogs. The comparison of the geometry and energy parameters of stable conformations of native peptide and its analogs permit to determine the important residues for spatial folding of molecule.

Key words: human hemokinin-1, glycine, analog, conformation, theoretical conformational analysis.

Гемокинин1 человека является продуктом сравнительно недавно клонированного препротахикининового гена (ТАС-4). По своему структурному строению и функциональным свойствам гемокинин 1 человека