

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ И КОНФОРМАЦИОННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ НЕЙРОПЕПТИДА *LEU*-ГАЛЛАТОСТАТИНА 2

Велиева Л.И., Алиев Р.Э.

Бакинский государственный университет

г. Баку, Азербайджан; e-mail: rashid_aliev@mail.ru, lala_veliyeva@rambler.ru

Поступила в редакцию: 04.07.2020

Аннотация. Проблема определения нативных конформаций нейропептидов относится к одной из актуальных в современной молекулярной биофизике, поскольку такие конформации являются в большинстве случаев основным фактором проявления их биологической активности. Несмотря на огромное разнообразие нейропептидных молекул, очевидно, что в основе молекулярных механизмов их сходной функциональной активности лежат одинаковые элементы пространственной организации. В работе методом молекулярной механики в приближении атом-атомных потенциальных функций исследовано пространственное строение и конформационные свойства нейропептида из семейства аллатостатинов, содержащего в своей химической структуре 14 аминокислотных остатков **Leu-Asn-Glu-Glu-Arg-Arg-Ala-Asn-Arg-Tyr-Gly-Phe-Gly-Leu-NH₂** и получившего название *Leu*-галлатостатин 2. Так как *Leu*-галлатостатин 2 включает в себя восемь аминокислотных остатков *Leu*-галлатостатина 3, исследование его пространственного строения проводилось на основе результатов расчета *Leu*-галлатостатина 3. Расчеты велись поэтапно и основывались на минимизации энергии внутримолекулярных взаимодействий (невалентных, электростатических, торсионных) в окрестностях углов внутреннего вращения, соответствующих всем комбинациям стабильных конформаций монопептидных остатков, образующих молекулу. Установлены 47 энергетически стабильных конформаций нейропептида, реализуемых в условиях неявно заданного водного окружения, относительная конформационная энергия которых варьирует в интервале значений 0-10 ккал/моль. Показано, что система водородных связей, несмотря на небольшой вклад в общую энергию молекулы, весьма важна для сохранения устойчивой структуры и ограничения подвижности *Leu*-галлатостатин 2. Согласно результатам исследования, основной вклад в стабилизацию низкоэнергетических конформаций молекулы вносят невалентные взаимодействия, вклад от которых варьирует в пределах -59÷-66 ккал/моль.

Ключевые слова: нейропептиды; структура; конформационный анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Аллатостатины биологически активные нейропептиды, которые играют ключевую роль в регуляции процессов синтеза и выделения ювенильных гормонов (гормонов роста) у различных видов насекомых в процессе их метаморфоза. Они были впервые идентифицированы в насекомых *D.punctata* американскими исследователями Pratt G.E. и Woodhead A.P. с соавторами в 1989 году. Интерес к исследованиям аллатостатинов был обусловлен не только их ролью в репродуктивных процессах насекомых, но и появившимися в последние годы данными об их участии в нейротрансмиссии и ингибировании перистальтического движения кишечника. Эксперименты с синтезированными аналогами аллатостатинов продемонстрировали высокую специфичность их действия и способность сохранять свою структуру на протяжении длительного периода развития насекомого. Было установлено, что аллатостатины стимулируют миотропную активность в тканях кишечника и в спинных сосудах, ингибируют продукцию желчи в жировом теле, увеличивают активность углеводородного фермента в средней кишке.

В настоящее время выделено более 70 аллатостатинов. К их числу относятся нейропептиды *leu*-галлатостатины, синтезируемые нейросекреторными клетками мозга *Calliphora Vomitoria* [1-3].

Важнейшим аспектом в исследованиях функциональной активности нейропептида является изучение молекулярных основ механизма его действия и создание эффективных аналогов с пролонгированным эффектом действия. Целью настоящего исследования явилось изучение пространственной структуры и конформационных свойств *leu*-галлатостатина 2. Химическое строение нейропептида и схема расчета низкоэнергетических конформационных состояний поэтапно наращиваемых ди-, три-, и пентапептидных фрагментов молекул приведена на рисунке 1.

Как видно из рисунка, *Leu*-галлатостатин 2 тетрадекапептидное соединение, включающие в себя восемь аминокислотных остатков *Leu*-галлатостатина 3. Поэтому исследование его пространственного строения проводилось на основе результатов расчета, полученных для *Leu*-галлатостатина 3 (рис. 1).

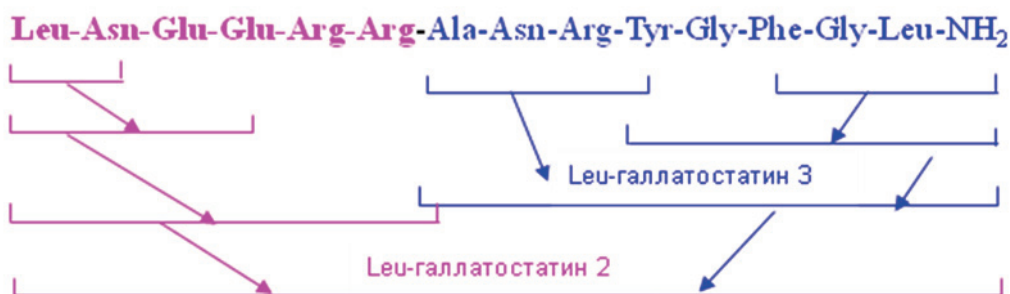


Рисунок 1. Схема расчета молекул *Leu*-галлатостатинов

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ И РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Низкоэнергетические конформационные состояния молекулы были установлены путем минимизации полной конформационной энергии в силовом поле атом-атомных потенциальных функций. При расчете энергии учитывались невалентные ($E_{лев}$) и электростатические ($E_{эл}$) взаимодействия атомов, водородные связи ($E_{вод}$) и торсионные вклады ($E_{торс}$), для описания которых были использованы полуэмпирические потенциальные функции, предложенные в работах [4,5]. Расчеты проводились в рамках жесткой валентной схемы, т.е. при фиксированных значениях длин валентных связей и валентных углов аминокислотных остатков, входящих в химическую структуру молекулы. Примененная система потенциальных функций и вычислительные программы были апробированы на большом числе пептидов и белков.

Для моделирования водного окружения использовалась параметризация, предложенная в работах [4-6]. Энергия водородных связей оценивалась с помощью потенциала Морзе при значении энергии диссоциации водородной связи, равной 1,5 ккал/моль, соответствующей расстоянию связи $NH...OC$ $r=1,8$ Å для водных растворов. Величина диэлектрической постоянной принята равной 10 [4,5]. При обсуждении результатов расчета была использована общепринятая классификация пептидных структур [6]. Выбор структурных вариантов при расчете конформаций отдельных пептидов осуществлялся на основе известных значений двугранных углов (ϕ и ψ) соответствующих низкоэнергетическим областям конформационной карты R,B,L и P для каждого монопептида. Отсчет двугранных углов проводился согласно международной номенклатуре [6].

Общее число структурных вариантов для *Leu*-галлатостатина 2 составлено на основе сочетания 38 структур *Leu*-галлатостатина 3 и 17 низкоэнергетических конформационных состояний *N*-концевого гексапептида, перекрывающихся по остатку *Ala*⁷. Результаты расчетов гексапептидного фрагмента обобщены в таблицах 1 и 2 (промежуточные этапы расчета опущены из-за однотипности процедуры вычислительного эксперимента). Они включают низкоэнергетические конформации десяти из 31 допустимых для такого фрагмента шейпов, относительная энергия которых удовлетворяет условию $E_{отн.} \leq 6$ ккал/моль.

Минимизация конформационной энергии всего нейропептида проводилась при варьировании 81 двугранного угла в основной и боковых цепях остатков для различных типов структур пептидного остова молекулы. Из 285 рассчитанных конформаций лишь 47 обладают энергией, значение которой удовлетворяет условию $\Delta E_{отн.} \leq 10$ ккал/моль.

Таблица 1. Энергетическое распределение оптимальных конформаций в шейпах фрагмента *Leu*¹-*Arg*⁶ *Leu*-галлатостатина 2

№	шейп	Интервал энергии $E_{отн.}$ (ккал/моль)				
		0 ÷ 1	1 ÷ 2	2 ÷ 3	3 ÷ 4	4 ÷ 5
1.	<i>ffffee</i>	-	-	1	-	1
2.	<i>ffffef</i>	1	-	-	-	-
3.	<i>ffefee</i>	-	-	-	1	-
4.	<i>ffefef</i>	-	-	-	-	1
5.	<i>ffeffe</i>	1	-	1	-	3
6.	<i>ffefff</i>	-	-	1	-	1
7.	<i>ffefff</i>	-	-	-	1	-
8.	<i>efefef</i>	-	-	-	-	1
9.	<i>efeffe</i>	-	-	1	-	-
10.	<i>feffff</i>	-	-	-	-	1
11.	<i>fefffe</i>	-	-	-	-	1
12.	<i>feffef</i>	-	-	-	-	1

Таблица 2. Низкоэнергетические конформационные состояния *N*-концевого гексапептидного фрагмента *Leu*-галлатостатина 2

шейп	конформация	Энергетические вклады (ккал/моль)				
		$E_{нев}$	$E_{эл}$	$E_{горс}$	$E_{полн}$	$E_{отн}$
<i>ffeffe</i>	$R_2R_{11}B_1R_2B_1L_3B$	-33,97	-2,62	5,79	-30,80	0,00
	$R_2R_{11}B_1R_2B_1L_3R$	-32,12	-2,34	5,68	-28,78	2,02
<i>ffffef</i>	$R_2R_{11}R_3R_2R_3L_2L$	-37,90	2,17	5,54	-30,19	0,61
<i>ffffee</i>	$R_2R_{11}R_3R_2R_3L_2B$	-36,97	2,90	5,83	-28,24	2,56
	$R_2R_{11}R_3R_2R_3L_2R$	-35,27	2,71	6,10	-26,46	4,34
<i>ffefef</i>	$R_2R_{11}B_1R_2R_3L_2L$	-31,39	0,73	4,74	-25,93	4,87
<i>ffefff</i>	$R_2R_{11}B_1R_2B_1L_2L$	-29,75	-1,07	4,58	-26,24	4,56
	$R_2R_{11}B_1R_2B_1L_3L$	-31,99	-2,22	5,79	-28,42	2,38
<i>efefef</i>	$B_2R_3B_3R_2R_3L_2L$	-31,20	1,46	3,53	-26,21	4,59
<i>efeffe</i>	$B_2R_3B_3R_2B_3L_3R$	-26,64	-2,14	5,30	-28,47	2,33
<i>feffff</i>	$R_2B_{11}R_3R_2B_3L_3B$	-32,23	1,91	4,44	-25,88	4,92
<i>feffff</i>	$R_2B_{11}R_3R_2B_3L_3L$	-32,23	1,99	4,27	-25,97	4,83
<i>feffef</i>	$R_2B_{11}R_3R_3B_2R_2R$	-33,00	2,18	9,05	-26,13	4,67

Несмотря на резкое различие в энергии полученных структур, все они представляют сочетание наиболее выгодных состояний фрагментов *Leu*¹-*Arg*⁶ и *Ala*⁷-*Leu*¹⁴ молекулы *Leu*-галлатостатина 2 (табл. 3). Важным фактором в формировании пространственной организации нейропептида является образование дальних взаимодействий, которые не разрушают межстаточных взаимодействий, образованных на свободных фрагментах рассчитываемой молекулы. Таким образом, подтверждается необходимость в согласованности ближних, средних и дальних взаимодействий, способствующей поэтапной укладке олигопептида в нативную конформацию. Важную роль в формировании такой конформации играют боковые цепи аминокислотных остатков, от ориентации которых зависит быстрая сходимость в процедуре минимизации конформационной энергии и нахождения ее глобального минимума. Поэтому важным этапом исследований является нахождение локальных минимумов в окрестностях полученных значений конформационной энергии путем построения серии конформационных карт φ - ψ и χ_i - χ_{i+1} . Они позволили устранить возникающие в ряде случаев при объединении фрагментов дестабилизирующие контакты и провести минимизацию энергии при варьировании ограниченного числа переменных.

Результаты исследований пространственного строения *Leu*-галлатостатина 2 обобщены в таблицах 3 и 4. В первой приведено распределение низкоэнергетических конформаций нейропептида в зависимости от структурного типа пептидного остова, т.е. классификация конформаций по шейпам. Как видно из таблицы, не все сочетания низкоэнергетических фрагментов *Leu*¹-*Arg*⁶ и *Ala*⁷-*Leu*¹⁴ приводят к образованию энергетически выгодных и стерически допустимых состояний нейропептида.

Таблица 3. Распределение низкоэнергетических конформаций по шейпам нейропептида *Leu*-галлатостатина 2

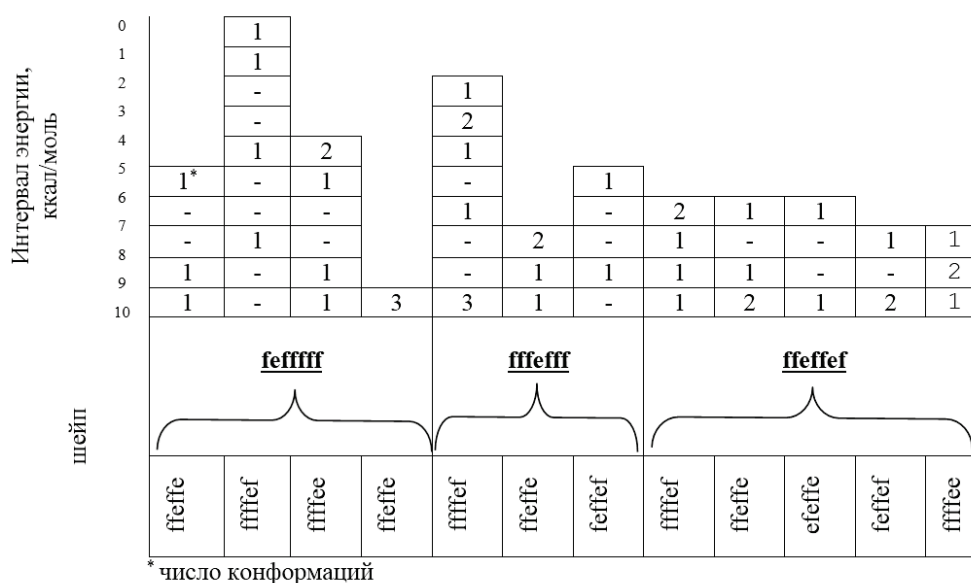
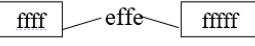
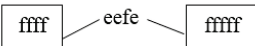

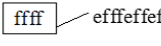


Таблица 4. Низкоэнергетические конформационные состояния нейропептида *Leu*-галлатостатина 2 и вклады от невалентных*, электростатических и торсионных взаимодействий

Классификация по группам	Шейп	конформация	Энергетические вклады (какл/моль)				
			$E_{нев.}$	$E_{эл.с.}$	$E_{тор.}$	$E_{пол.}$	$E_{отн.}$
I		$R_2R_{11}R_3R_2B_3R_2RB_{11}R_2B_3PB_2PB_{21}$	-65,60	4,15	24,51	-36,94	0,0
		$R_2R_{11}R_3R_3B_1R_2RB_{11}R_2B_3PB_2PB_{21}$	-65,29	3,12	26,43	-35,74	1,2
		$R_2R_{11}R_3R_2R_3L_2BL_{11}R_2B_3PB_2PB_{21}$	-65,45	4,21	29,10	-32,14	4,6
		$R_2R_{11}R_3R_2R_3L_2RB_{21}R_2B_3PR_2RR_{21}$	-63,47	2,98	28,75	-31,74	5,2
II		$R_2R_{11}R_3R_2B_1R_2RR_{11}R_2R_3PB_2PB_{32}$	-65,42	3,77	27,21	-34,44	2,3
		$R_2R_{11}R_3R_2B_1R_2RR_{11}R_2R_3PB_2PB_{31}$	-65,42	3,12	28,96	-33,34	3,6
		$R_2R_{31}R_3R_3B_3R_2RR_{11}R_2R_3PB_2PB_{32}$	-65,71	3,56	29,01	-33,14	3,8
		$R_2R_{31}R_3R_3B_3R_2RR_{11}R_2R_3PB_2PB_{31}$	-64,37	2,11	29,52	-32,74	4,2
III		$R_2R_{11}R_3R_2B_3R_2RR_{22}B_3B_1PR_1PR_{32}$	-60,84	2,60	28,00	-30,24	6,7
		$R_2R_{11}R_3R_3B_1R_2RR_{21}B_3B_1PR_1PR_{32}$	-64,63	4,27	30,62	-29,74	7,2
IV	ffeffeffeff	$R_2R_{11}B_1R_2B_1L_3BL_{22}L_1B_1PR_1PR_{31}$	-60,08	2,70	28,64	-28,74	8,2
		$R_2R_{11}B_1R_2B_1L_3RR_{22}B_3B_1PR_1PB_{21}$	-59,99	2,74	29,41	-27,84	9,1
		$R_2R_{11}B_1R_2B_1L_3RR_{32}B_3B_1PR_1PR_{32}$	-59,67	3,05	29,28	27,34	9,6
	effeffeffeff	$B_2R_{31}B_3R_2B_3L_3RR_{22}B_3B_1PR_1PB_{21}$	-61,25	2,98	31,13	-27,14	9,8
$R_2R_{11}B_1R_2B_1L_3RR_{32}B_3B_1PR_1PB_{32}$		-60,54	3,11	30,39	-27,04	9,9	

* Примечание: Энергия от образования водородных связей включена в $E_{нев}$

Стабильность рассчитанных структур в зависимости от стереохимического расположения аминокислотных остатков и их боковых цепей в линейной последовательности нейропептида определяется наличием упорядоченных участков в его пространственной организации. Благодаря таким характерным элементам, все конформации нейропептида можно классифицировать на четыре группы.

I группа объединяет конформации, содержащие два регулярных участка, расположенных на противоположных концах нейропептида. Они характеризуются образованием двух витков α -спирали, разделенных участком $Arg^6 - Arg^9$, содержащим заряженные боковые цепи остатков аргинина. Анализ межостаточных взаимодействий в таких конформациях показал, что боковые цепи Arg^6 и Arg^9 расположены на поверхности компактной структуры нейропептида и не участвуют в стабилизации их пространственной структуры. Четыре низкоэнергетические конформации шейпов $ffffeffefffff$ и $ffffeefefffff$ в группе I различаются состоянием пептидной цепи в *Ala* и различными ориентациями боковых цепей Arg^6 и Arg^9 . Самая лучшая по энергии конформация нейропептида ($E_{отн.} = 0$ ккал/моль, табл. 4) состоит из α -спиральной конформации *Leu*-галлатостатина 3 и одной из низкоэнергетических конформаций гексапептида *Leu*¹-*Arg*⁶ (табл. 2).

Низкоэнергетические конформации второй группы содержат три α -спиральных участка в структуре нейропептида и различаются конформационным состоянием остатков в шестом (*Arg*⁶) и одиннадцатом (*Gly*¹¹) положениях линейной последовательности аминокислот. В отличие от других остатков, глицин не содержит боковой цепи, поэтому *C*-концевой α -спиральный фрагмент представлен двумя возможными ориентациями относительно менее подвижного *N*-концевого участка. Различие в относительной энергии конформаций этой группы варьирует в пределах 0-1 ккал/моль. Поверхность компактных структур этой группы нейропептида представлена лишь одной положительно заряженной боковой цепью остатка *Arg*⁶. Поэтому такие структуры должны обладать меньшей реакционной способностью по сравнению с конформациями I группы.

Конформации, характеризующиеся α -спиральной конформацией *N*-концевого пентапептидного фрагмента объединены в группу III. Они представлены большим числом конформационных состояний на *C*-концевом фрагменте, но лишь два из них имеют энергию, значение которой не превышает энергии глобальной конформации нейропептида более, чем на 10 ккал/моль. Четвертую группу образуют те конформации, которые не содержат жестких нуклеаций или стабильных регулярных элементов в своей пространственной организации. Низкоэнергетические представители таких структур приведены в таблице 4.

Список литературы/ References:

1. Duve H., Johnsen A.H., Scott A.G., Yu C.G., Yagi K.J., Tobe S.S., Thorpe A. Callatostatins: Neuropeptides from the blowfly *Calliphora vomitoria* with sequence homology to cockroach allatostatins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, pp. 2456-2460.
2. Duve H., Johnsen A.H., Maestro J.L., Scott A.G. East P.D., Thorpe A. Identification of the dipteran *Leu*-callatostatin peptide family: the pattern of precursor processing revealed by isolation studies in *Calliphora vomitoria*. *Regul. Pept.*, 1996, vol. 67, pp. 11-19.
3. Duve H., Thorpe A. Distribution and functional significance of *Leu*-callatostatins in the blowfly *Calliphora vomitoria*. *Cell Tissue Res.*, 1994, vol. 276, pp. 367-379.

4. Momany F.A., McGuire 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. *J. Phys. Chem.*, 1975, vol. 79, pp. 2361-2381.
5. Popov E.M. *The Structural Organization of Proteins* (in Russian), Nauka, Moscow, 1989, 352 p.
6. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains. *Pure Appl. Chem.*, 1974, vol. 40, pp. 291-308.

SPATIAL STRUCTURE AND CONFORMATION MOBILITY OF NEUROPEPTIDE LEU-CALLATOSTATIN 2

Veliyeva L.I., Aliyev R.E.

Baku State University

Baku, Azerbaijan; e-mail: rashid_aliev@mail.ru, lala_veliyeva@rambler.ru

Abstract. The problem of determining the native conformations of neuropeptides is one of the most relevant ones in modern molecular biophysics, since such conformations are in most cases is the main factor in the manifestation of their biological activity. Despite the huge variety of neuropeptide molecules, it is obvious that the molecular mechanisms of their similar functional activity are based on the same elements of spatial organization. In this work the spatial structure and conformational properties of a neuropeptide from the allatostatin family and containing 14 amino acid residues in its chemical structure Leu-Asn-Glu-Glu-Arg-Arg-Ala-Asn-Arg-Tyr-Gly-Phe-Gly-Leu-NH₂ was studied by the method of molecular mechanics in the approximation of atom atomic potential functions and as a result was called Leu-callatostatin 2. Since Leu-callatostatin 2 includes eight amino acid residues of Leu-callatostatin 3, its spatial structure was studied based on the results of calculation of Leu-callatostatin 3. Calculations were carried out in stages and were based on minimizing the energy of intramolecular interactions (non-valent, electrostatic, torsion) in the vicinity of the angles of internal rotation, corresponding to all combinations of stable conformations of mono-peptide residues that form the molecule. 47 energetically stable conformations of the neuropeptide were established, which are realized under conditions of an implicitly specified aqueous environment, the relative conformational energy of which varies in the range of 0–10 kcal / mol. It was shown that the hydrogen bond system, despite a small contribution to the total energy of the molecule, is very important for maintaining a stable structure and limiting the mobility of Leu-callatostatin 2. According to the results of the study, the main contribution to the stabilization of low-energy conformations of the molecule is made by non-valent interactions, the contribution of which varies within $-59 \div -66$ kcal / mol.

Key words: neuropeptides; structure; conformational analysis.