

## КОНФОРМАЦИОННОЕ ПОВЕДЕНИЕ МОЛЕКУЛЫ ГИЛАМБАТИНА И ЕГО ФРАГМЕНТА (5-12)

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: 05.07.2021

**Аннотация.** Тахикининовый пептид гиламбатин был выделен и химически охарактеризован из метанольных экстрактов кожи *Hylambates maculatus*, африканской лягушки-ракофориды. Гиламбатин состоит из двенадцати аминокислотных остатков в последовательности – DPPDPNRFYGMМамид. Он структурно отличается от всех других известных тахикининов, главным образом, наличием остатка метионина, заменяющего обычный остаток лейцина в положении 2 от С-конца. Было показано, что его С-концевая октапептидная последовательность (5-12) была такой же активной, как и сама исходная молекула. В данной работе было проведено исследование конформационных свойств молекулы гиламбатина и его фрагмента (5-12), методом молекулярной механики. В результате минимизации энергии составленных структурных вариантов были найдены низкоэнергетические конформации С-концевого октапептида (5-12) гиламбатина. Энергетически наиболее предпочтительными оказались  $\alpha$ -спиральные конформации октапептида. Было показано, что низкоэнергетические конформации октапептида, в основном, формируют  $\alpha$ -спираль на С-конце молекулы. Полученные конформации стабилизируются в основном энергией дисперсионных взаимодействий, т.е. в конечном счете, плотностью упаковки. Расчет показал, что самые низкоэнергетические конформации октапептида отличаются друг от друга относительной подвижностью N-концевого трипептидного участка фрагмента. Сопоставление низкоэнергетических конформаций С-концевых пентапептида, октапептида и целой молекулы гиламбатина обнаруживает некоторую преемственность энергетически предпочтительных структур. Во всех рассчитанных пептидах предпочтение отдается структурам, ведущим к удлинению  $\alpha$ -спирали. Конформационный анализ последовательно наращиваемых С-концевых фрагментов молекулы гиламбатина выявил значительную преемственность результатов по мере увеличения длины рассматриваемой пептидной цепи. Действительно, начиная от С-концевого пентапептида и кончая додекапептидами, от фрагмента к фрагменту энергетически предпочтительными оказывались  $\alpha$ -спиральные конформации.

**Ключевые слова:** гиламбатин, гиламбатин (5-12), остарептиде, конформация, метод молекулярной механики.

Определение пространственного строения биологически активных природных пептидов позволяет определить структурные критерии, необходимые для их функционирования и может способствовать созданию более эффективных лекарственных препаратов. Член семейства тахикининов, гиламбатин, был выделен и химически охарактеризован из метанольных экстрактов кожи *Hylambates maculatus*, африканской лягушки-ракофориды. Гиламбатин обладает поразительной характеристикой, впервые наблюдаемой в семействе тахикининовых пептидов, наличием последовательности Met-Met-NH<sub>2</sub> в С-концевом дипептиде. Он структурно отличается от всех других известных тахикининов, главным образом, наличием остатка метионина, заменяющего обычный остаток лейцина в положении 2 от С-конца. [1]. Тахикининовые нейропептиды участвуют в патогенезе бронхиальных, воспалительных и желудочно-кишечных болезней, а также приступов мигрени, депрессии, эпилепсии и переносе болевых ощущений. Кроме того, было показано, что вводимый внутривенно гиламбатин значительно повышает уровень глюкозы и инсулина в плазме крови [1]. В работе [2] было показано, что молекула гиламбатина и его 12 фрагментов были протестированы на препарате подвздошной кишки морских свинок на сократительную активность [2]. Все фрагменты, кроме трех, обладали сократительной активностью. С-концевой фрагмент такой же длины, как октапептидная последовательность, был, по крайней мере, таким же активным, как и исходная молекула. Гептапептидный фрагмент (Hyl6-12) и гексапептидный фрагмент (Hyl7-12) были менее активными, а С-концевой пентапептидный фрагмент (Hyl8-12) и N-концевой гексапептидный фрагмент (Hyl1-6) были гораздо менее активными. N-концевой пентапептидный фрагмент (Hyl1-5) и N-концевой фрагмент, из которого были удалены N-концевые остатки Asp или Asp-Pro (Hyl2-6, Hyl3-6), были неактивными при используемых дозах. Эффективные и селективные агонисты и антагонисты тахикининовых рецепторов, созданные на основе относительно низкомолекулярного октапептида Hyl-1(5-12) могут иметь большой терапевтический потенциал. Поэтому определение особенностей пространственной структуры молекулы гиламбатина и его фрагментов может способствовать целенаправленному поиску ее эффективных аналогов в качестве лекарственных препаратов для стимулирования или блокирования конкретного физиологического воздействия в лечении ряда заболеваний. С этой целью в данной работе были исследованы пространственное строение молекулы гиламбатина и ее фрагментов методами молекулярной механики (AM1).

При параллельном биоанализе ряда тестовых объектов *in vitro* и *in vivo* гиламбатин и другой тахикининовый пептид физалаемин были почти неотличимы друг от друга с небольшими умеренными количественными различиями.

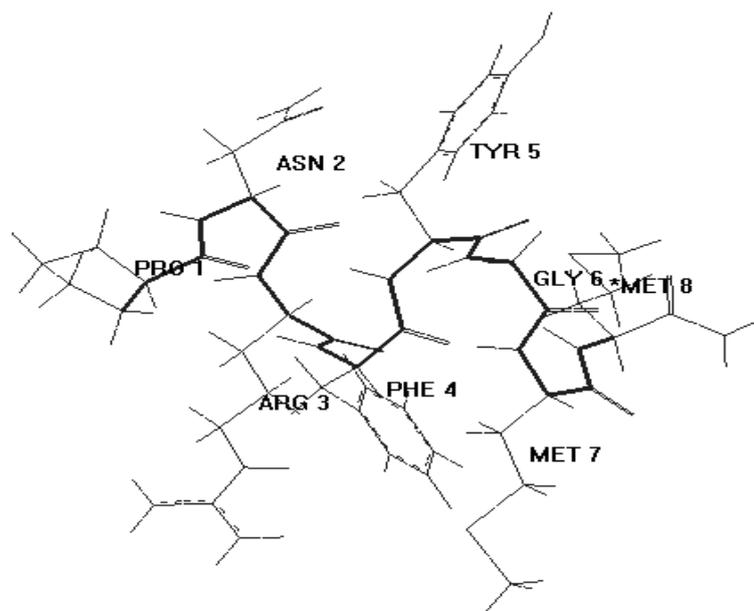
В данной работе расчет стабильных конформаций пептидов проводился с помощью программы и системы потенциальных функций, ранее описанных и примененных в работе [3]. При обсуждении результатов расчета была использована принятая классификация пептидных структур [3]. Конформационное состояние каждого остатка определялось значениями двугранных углов  $\varphi$ ,  $\psi$  и  $\omega$  основной цепи и  $\chi^i$ , боковых цепей. Введено понятие формы остатка, которое характеризует область (R, B, L или P) значений углов  $\varphi$  и  $\psi$ . Углы  $\varphi$  и  $\psi$  основной цепи в конформациях находятся из низкоэнергетических областей стерической карты: R ( $\varphi, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$ ), B ( $\varphi = -180^\circ \div 0^\circ, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$ ), L ( $\varphi, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$ ) и P ( $\varphi = 0^\circ \div 180^\circ, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$ ). Выбор структурных вариантов при расчете конформаций отдельных трипептидов осуществлялся на основе известных значений двугранных углов ( $\varphi$  и  $\psi$ ) соответствующих низкоэнергетическим областям конформационной карты R, B и L для каждого монопептида, а для монопептида пролина конформации выбирались из двух B и R областей [3]. Отсчет двугранных углов вращения  $\varphi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  и  $\chi^i$  проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB [4]. Расчет стабильных конформаций пептидов проводился с помощью программы [5]. Поиск минимумов потенциальной энергии осуществлялся методом сопряженных градиентов [5]. Расчеты и оптимизация конформационных состояний проводились с использованием комплекса сервисных программ HyperChem v. 8.0 [6], позволяющего проводить расчеты и оптимизацию конформационных состояний молекул методом молекулярной механики с силовым полем AM1.

Исследование пространственного строения биологически активного С-концевого октапептида гиламбатина: Pro5-Asn6-Arg7-Phe8-Tyr9-Gly10-Met11-Met12- NH<sub>2</sub> проводилось на основе поэтапного подхода с использованием предварительно рассчитанных стабильных конформаций перекрывающихся по двум остаткам тетрапептида Pro5-Phe8 и С-концевого пентапептида Phe8-Met12-NH<sub>2</sub>. При составлении структурных вариантов октапептида ориентации боковых цепей остатков перекрывающегося участка Phe7-Tyr8 брались с учетом сохранения максимума межостаточных взаимодействий, образуемых данными остатками в перекрывающихся фрагментах. Таким образом, было составлено более 200 структурных вариантов, охватывающих все шейпы октапептида. В результате минимизации энергии составленных структурных вариантов были найдены низкоэнергетические конформации С-концевого октапептида Pro5-Asn6-Arg7-Phe8-Tyr9-Gly10-Met11-Met12 - NH<sub>2</sub> молекулы гиламбатина.

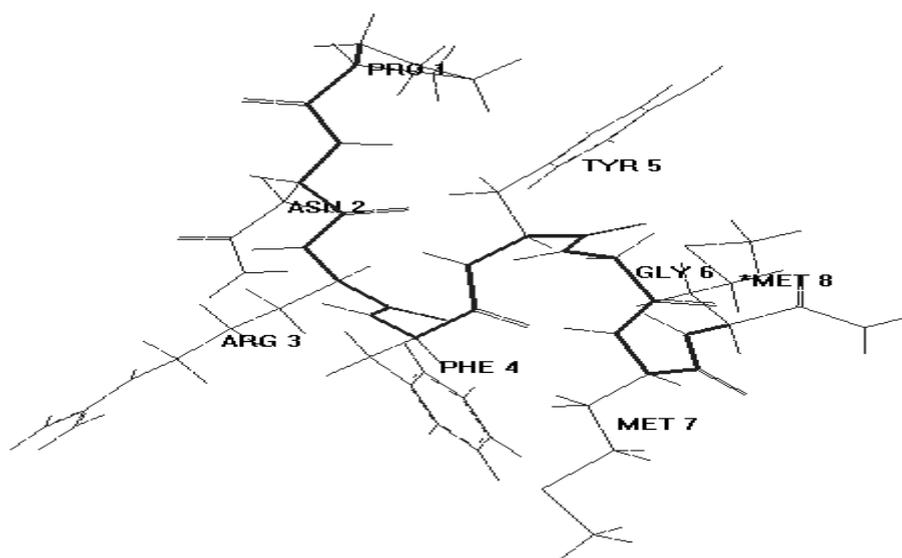
Для каждой из рассчитанных конформаций определены вклады всех видов энергий взаимодействия октапептида. В таблице 1 приведены энергетические параметры стабильных конформаций октапептида гиламбатина. Как следует из таблицы, в интервал относительной энергии 0-10 ккал/моль входят конформации 10 структурных типов октапептида. Не трудно заметить, что все низкоэнергетические конформации формируют  $\alpha$ -спираль на С-конце молекулы. Иными словами, чем длинее  $\alpha$ -спираль на С-конце пептида, тем стабильнее структура октапептида. Эти конформации отличаются в основном энергией дисперсионных взаимодействий, т.е. в конечном счете, плотностью упаковки пептидной цепи. Практически самые низкоэнергетические конформации октапептида отличаются друг от друга относительной стабильностью N-концевого трипептидного участка фрагмента. Расчет конформаций октапептида молекулы гиламбатина позволяет сделать заключение, что этот

**Таблица 1.** Энергетические параметры внутримолекулярных взаимодействий в стабильных конформациях молекулы Pro5-Asn6-Arg7-Phe8-Tyr9-Gly10-Met11-Met12- NH<sub>2</sub> октапептида гиламбатина

№	Конформация	Энергетические вклады, ккал/моль				
		E <sub>нев</sub>	E <sub>эл</sub>	E <sub>торс</sub>	E <sub>полн</sub>	E <sub>отн</sub>
1	RR <sub>2</sub> R <sub>22</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-39,1	7,2	5,8	-26,1	0
2	RB <sub>2</sub> R <sub>21</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-36,0	6,5	4,4	-25,1	1,0
3	BR <sub>2</sub> R <sub>21</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-38,2	7,5	5,8	-24,8	1,3
4	BB <sub>2</sub> B <sub>21</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-35,2	6,4	4,5	-24,3	1,8
5	RB <sub>2</sub> R <sub>21</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-36,7	7,1	5,3	-24,3	1,8
6	RB <sub>2</sub> B <sub>31</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-33,1	6,6	4,4	22,1	4,0
7	BR <sub>2</sub> B <sub>21</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-34,3	7,1	6,7	-20,6	5,5
8	RR <sub>2</sub> B <sub>11</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-32,4	5,7	6,3	-20,4	5,7
9	BB <sub>2</sub> B <sub>11</sub> B <sub>1</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-32,1	7,4	4,9	-19,8	6,3
10	BR <sub>2</sub> B <sub>13</sub> B <sub>2</sub> R <sub>3</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-32,9	7,2	6,6	-19,1	7,0



a)



б)

**Рисунок 1.** Молекулярные модели энергетически наиболее предпочтительных пространственных структур С-концевого октапептида гиламбатина. Жирной линией указан пептидный остов молекулы

С-концевой фрагмент обладает заметной конформационной ограниченностью. Самой низкоэнергетической конформацией октапептида является  $\alpha$ -спиральная конформация. Эта конформация превосходит следующую по стабильности конформацию на 1,0 ккал/моль. Спиральная структура, благодаря периодичности своего строения, характеризуется образованием эффективных три-, тетра- и пентапептидных межостаточных взаимодействий. Этого нельзя сказать о других низкоэнергетических структурах, строение пептидного остова которых носит более неупорядоченный характер. Проекция двух энергетически предпочтительных конформаций октапептида гиламбатина представлены на рисунке 1 (а, б).

Расчет конформаций октапептида молекулы гиламбатина позволяет сделать заключение, что С-концевой фрагмент обладает заметной конформационной ограниченностью. Результаты расчетов конформаций N-концевого пентапептида Asp1-Pro2-Pro3-Asp4-Pro5 свидетельствуют о заметной конформационной лабильности этого фрагмента. В данном пентапептиде имеются два сопряженных остатка пролина и в пятой позиции еще один пролин, которые ограничивают конформационные возможности предыдущих остатков. Остатки пролина, как известно [7], обладают конформационным своеобразием, благодаря циклическому строению основной цепи. Эти остатки пролина ограничивают конформационные возможности предыдущего остатка, для которого реализуется только В форма основной цепи. Поэтому для рассматриваемого пентапептида стерически допустимы только две формы основной цепи ВВВВВ и ВВВВВ.

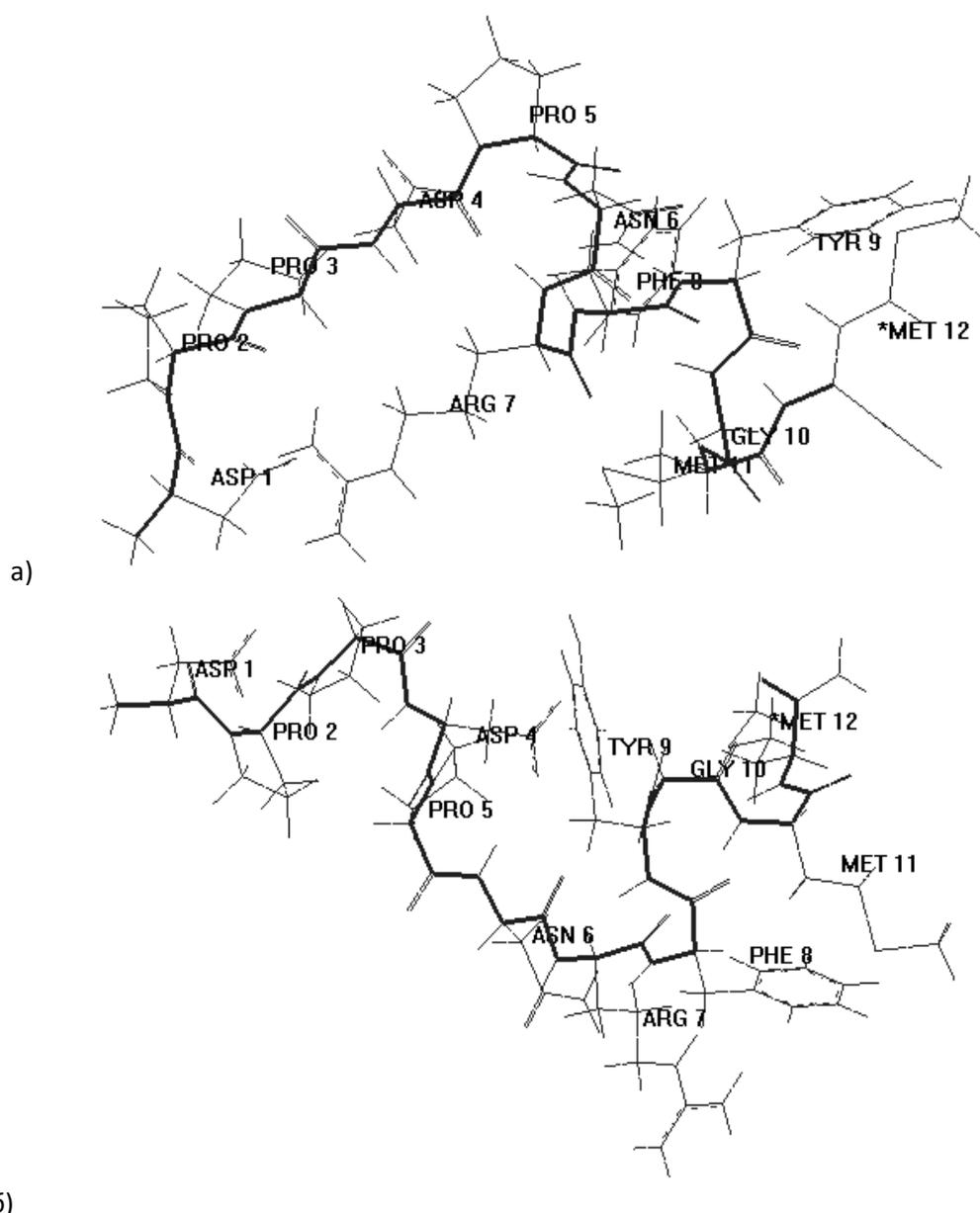
Исследование пространственного строения молекулы гиламбатина проводилось на основе стабильных конформаций С-концевого октапептида и низкоэнергетических конформаций N-концевого пентапептида. Расчеты показали, что молекула гиламбатина может формировать стабильные конформационные состояния с

одинаковым С-концевым структурным сегментом. Одни из них содержат около двух витков  $\alpha$ -спирали, а другие представляет собой свернутую неупорядоченную структуру с небольшим витком спирали на С-конце. Эти структуры мало отличаются по величине относительной энергии. Иерархия предпочтительных структур спирального типа при переходе от октапептидного фрагмента к целой молекуле сохраняется. По-прежнему энергетически предпочтительны конформации, в которых  $\alpha$ -спираль формируется на С-конце молекулы. Следует отметить, что образование стабильных конформаций молекулы гиламбатина сопровождается созданием ряда внутримолекулярных водородных связей. Так, например, в глобальной конформации образуется система регулярных водородных связей, характерных для правой  $\alpha$ -спирали. Распределение конформаций молекулы гиламбатина по энергии в основном зависит от числа взаимодействий между остатками лабильного и консервативного фрагментов. Интересно отметить, что  $\alpha$ -спиральные конформации молекулы гиламбатина, составленные из наилучших по ближним и средним взаимодействиям форм фрагментов пентапептида и октапептида, оказываются самыми предпочтительными и на целой молекуле. На рисунке 2 приведены проекции двух наиболее стабильных конформаций молекулы гиламбатина. Контур основной цепи конформаций показаны жирной линией.

Тем самым предполагается, что устойчивый  $\alpha$ -спиральный сегмент на С-конце молекулы гиламбатина является минимальным структурным элементом, необходимым для связывания с рецептором, а N-концевая относительно подвижная часть этих пептидов может выполнять двоякую роль с одной стороны стабилизировать конформацию целой молекулы, а с другой стороны обеспечивать селективность к одному из тахикининовых рецепторов. Проведенное исследование показало также степень конформационной подвижности молекулы гиламбатина.

**Таблица 2.** Двугранные углы (град) аминокислотных остатков молекулы гиламбатина в низкоэнергетических конформациях I – B<sub>2</sub>BBB<sub>2</sub> RR<sub>2</sub>R<sub>32</sub>R<sub>2</sub> R<sub>2</sub>RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub> (E<sub>отн</sub> = 0,0 ккал/моль), II – B<sub>2</sub>BRB<sub>2</sub>RB<sub>2</sub> R<sub>1</sub>B<sub>32</sub> R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub> (E<sub>отн</sub> = 1,7 ккал/моль)

Остаток	Конформация	Основная цепь			Боковая цепь			
		$\phi$	$\psi$	$\omega$	$\chi_1$	$\chi_2$	$\chi_3$	$\chi_4$
Asp <sup>1</sup>	I	-66	138	177	190	79	-	-
	II	-66	139	176	191	79	-	-
Pro <sup>2</sup>	I	-60	153	168	-	-	-	-
	II	-60	171	172	-	-	-	-
Pro <sup>3</sup>	I	-60	146	182	-	-	-	-
	II	-60	-41	182	-	-	-	-
Asp <sup>4</sup>	I	-124	122	186	187	92	-	-
	II	-125	133	184	191	92	-	-
Pro <sup>5</sup>	I	-60	-44	198	-	-	-	-
	II	-60	-41	188	-	-	-	-
Asn <sup>6</sup>	I	-84	-53	193	184	88	-	-
	II	-96	145	190	186	90	-	-
Arg <sup>7</sup>	I	-101	-57	-174	-56	183	182	180
	II	-88	-49	-179	-50	180	188	179
Phe <sup>8</sup>	I	-64	-49	181	181	91	-	-
	II	-61	-48	181	180	91	-	-
Tyr <sup>9</sup>	I	-74	-30	-184	181	90	-	-
	II	-74	-32	-186	181	89	-	-
Gly <sup>10</sup>	I	-62	-39	-178	-	-	-	-
	II	-62	-39	-179	-	-	-	-
Met <sup>11</sup>	I	-82	-55	-177	180	172	66	53
	II	-83	-55	-177	181	172	67	52
Met <sup>12</sup>	I	-87	-54	180	-60	184	180	182
	II	-87	-54	179	-59	184	180	182



**Рисунок 2.** Молекулярные модели энергетически наиболее предпочтительных пространственных структур молекулы додекапептида гиламбатина. Жирной линией указан пептидный остов молекулы.

Таким образом, результаты конформационного анализа молекулы гиламбатина и ее С-концевого октапептида выявили ограниченный набор низкоэнергетических структур. Как видим С-концевой фрагмент молекулы в свободном состоянии отдает предпочтение формированию  $\alpha$ -спирали. Принимая во внимание, тот факт, что молекула октапептида сама по себе обладает биологической активностью, полученные величины энергетических и геометрических параметров наиболее стабильных конформаций дают представление о предпочтительной пространственной структуре додекапептидной молекулы. Можно предположить, что среди рассчитанных низкоэнергетических структур находится биологически активная конформация молекулы гиламбатина и ее С-концевого октапептида (5-12), способная связываться с рецептором.

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

1. Güllner 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. Inoue A., Fukuyasu T., Nakata Y., Yajima H., Nomizu M., Inagaki Y., Asano K., Segawa T. Structure-activity relationship of hylambatin and its fragments as studied in the guinea-pig ileum. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1988, vol. 40, iss. 1, pp. 72-73.
3. Агаева Г.А., Агаева У.Т., Годжаев Н.М. Особенности пространственной организации молекул гемокинина-1 человека и гемокинина-1 мыши/крысы. *Биофизика*, 2015, т. 60, вып. 3, с. 457-470. [Agaeva G.A., Agaeva U.T., Godzhaev N.M. Features of the spatial organization of the molecules of human hemokinin-1 and mouse / rat hemokinin-1. *Biophysics*, 2015, vol. 60, no. 3, pp. 457-470. (In Russ.)]

4. 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.
5. Максумов И.С., Исмаилова Л.И., Годжаев Н.М. Программа полуэмпирического расчета конформаций молекулярных комплексов на ЭВМ. *Журнал структурной химии*, 1983, т. 24, № 4, с. 147-148. [Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godzhaev N.M. Program for semi-empirical calculation of conformations of molecular complexes on a computer. *Journal of Structural Chemistry*, 1983, vol. 24, no. 4, pp. 147-148. (In Russ.)]
7. Schimmel P.R., Flory P.J. Conformational energies and conformational statistics of copolypeptides containing L-proline. *J. Mol. Biol.*, 1968, vol.34, pp. 105-111.

#### CONFORMATIONAL BEHAVIOUR OF HYLAMBATIN AND IT (5-12) FRAGMENT

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

Baku State University

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

**Abstract.** The tachykinin peptide hylambatin was isolated and chemically characterized from methanol extracts of the skin of *Hylambates maculatus*, an African crustacean frog. Hylambatin consists of twelve amino acid residues in the sequence - DPPDPNRFYGMMamide. It differs structurally from all other known tachykinins mainly by the presence of a methionine residue replacing the usual leucine residue at position 2 from the C-terminus. It was shown that its C-terminal octapeptide sequence (5-12) was as active as the parent molecule. In this work, the study of the conformational properties of the hylambatin molecule and its fragment (5-12) was carried out by the method of molecular mechanics. As a result of minimizing the energy of the composed structural variants, low-energy conformations of the C-terminal octapeptide (5-12) hylambatin were found. The  $\alpha$ -helical conformations of the octapeptide were found to be energetically most preferable. It has been shown that the low-energy conformations of the octapeptide mainly form the  $\alpha$ -helix at the C-terminus of the molecule. The resulting conformations are stabilized mainly by the energy of dispersion interactions, i.e. ultimately, packing density. The calculation showed that the lowest-energy conformations of the octapeptide differ from each other in the relative mobility of the N-terminal tripeptide region of the fragment. Comparison of the low-energy conformations of the C-terminal pentapeptide, octapeptide, and the whole hylambatin molecule reveals some continuity of energetically preferred structures. In all calculated peptides, preference is given to structures leading to the elongation of the  $\alpha$ -helix. Conformational analysis of the sequentially extended C-terminal fragments of the hylambatin molecule revealed a significant consistency of results with an increase in the length of the peptide chain under consideration. Indeed, starting from the C-terminal pentapeptide and ending with dodecapeptidamide, the  $\alpha$ -helical conformations turned out to be energetically preferable from fragment to fragment.

**Key words:** hylambatin, octapeptide (5-12), conformation, molecular mechanics method.