

орбиталей интерпретируется как первая энергия возмущения и равна 9.826 эВ для N¹H и 9.985 эВ для N³H форм гомокарнозина. Чем ближе значения энергий этих орбиталей, тем больше система имеет сродство к электрону. Сравнение орбитальных энергий показывает, что самая маленькая разность энергий HOMO и LUMO орбиталей наблюдается в анзерине с формой имидазольного кольца N¹H (~9.743), а самая большая - в карнозине с формой имидазольного кольца N³H (~10.323). Таким образом, сравнительный анализ орбитальных энергий показывает большую реакционную способность анзерина с формой имидазольного кольца N¹H.

Список литературы / References:

1. Болдырев А.А. *Карнозин*. М.: Изд-во МГУ, 1998, 320 с. [Boldyrev A.A. *Carnosine*. Moscow: Publishing house of the Moscow State University, 1998, 320 p. (In Russ.)]
2. Boldyrev A. Carnosine as natural antioxidant and neuroprotector: biological functions and possible clinical use. In: *Free Radicals, Nitric Oxide and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects* (A. Tomasi et al., Eds.) IOS Press, 2002, pp. 206-221.
3. Renner C., Seyffarth A., Garcia S. de Arriba et al. Carnosine Inhibits Growth of Cells Isolated from Human Glioblastoma Multiforme. *Int J Pept Res Ther.*, 2008, vol. 14, pp. 127-135.
4. Vistoli G., Pedretti A., Cattaneo M. [et al.] Homology Modeling of Human Serum Carnosinase, a Potential Medicinal Target, and MD Simulations of Its Allosteric Activation by Citrate. *J. Med.Chem.*, 2006, no. 49, pp. 3269-3277.
5. Guiotto A., Calderan A., Ruzza P., Borin G. Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Curr. Med. Chem.*, 2005, vol. 12, pp. 2293-2315.
6. Bauer K. Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain. *Neurochem. Res.*, 2005, no. 30, pp. 1339-1345.
7. Aldini G., Facino R.M., Beretta G., Carini M. Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives. *Biofactors*, 2005, vol. 24, pp. 77-87.
8. Козина Л.С., Стволинский С.Л., Степанова М.С. [и др.] Регуляторные пептиды защищают нейроны мозга от гипоксии в экспериментах *in vivo*. *Доклады РАН*, 2008, т. 418, № 3, с. 419-422. [Kozina LS, Stvolinsky SL, Stepanova M.S. [et al.] Regulatory peptides protect brain neurons from hypoxia in the experiments *in vivo*. *Reports of the Russian Academy of Sciences*, 2008, vol. 418, no. 3, pp. 419-422. (In Russ.)]
9. Hipkiss A.R. [et al.] Reaction of carnosine with aged proteins: another protective process? *Ann N Y Acad Sci.*, 2002, vol. 959, pp. 285-294.
10. Tabakman R., Lazarovici P., Kohen R. Neuroprotective effects of carnosine and homocarnosine on pheochromocytoma PC12 cells exposed to ischemia. *J Neurosci Res*, 2002, vol. 68 (4), pp. 463-469.
11. Urazaev A.K., Naumenko N.V., Nikolsky E.E. [et al.] Carnosine and other imidazole-containing compounds enhance the postdenervation depolarization of the rat diaphragm fibres. *Physiol Res*, 1998, vol. 47, no. 4, pp. 291-295.
12. Demukhamedova S.D., Alieva I.N., Godjajev N.M. Spatial and electronic structure of monomeric and dimeric complexes of carnosine with zinc. *J. Struct. Chem.*, 2010, vol. 51, no. 5, pp. 824-832.
13. Демухамедова С.Д. Теоретическое исследование пространственной структуры различных комплексов карнозина и анзерина с цинком. *Материалы докладов V съезда Биофизиков России*, Ростов-на-Дону, 2015, с. 227. [Demukhamedova S.D. Theoretical study of the spatial structure of various complexes carnosine and anserine with zinc. *Proceedings of the V Congress of Biophysics, Russian*, Rostov-on-Don, 2015, pp. 227. (In Russ.)]
14. Itoh H., Yamane T., Ashida T., Kakudo M. Carnosine (β -alanyl-L-histidine). *Acta Crystallogr.*, 1977, vol. B33, pp. 2959-2961.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ НЕОКИТОРФИНА

Ахвердиева Г.А.

Институт физических проблем, Бакинский Государственный Университет

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

e-mail: hagverdignara@gmail.com

Аннотация. В работе представлены результаты исследования некиоторфина методами молекулярной механики и молекулярной динамики. Определены энергетические и геометрические параметры оптимальных структур пептида. Установлено, что пространственное строение некиоторфина в условиях водного окружения может быть описано набором низкоэнергетических состояний, находящихся в конформационном равновесии; спиральные или полусвернутые конформации отвечают наиболее стабильным состояниям данной молекулы. Выявлено, что для N-концевого трипептидного участка молекулы характерен высокий уровень подвижности, в отличие от его C-концевого дипептидного участка, свернутая структура которого сохраняется на протяжении всего этапа моделирования. Конформационная жесткость и ориентация боковых цепей указанного дипептидного участка играют экранирующую роль в сохранении устойчивости химической связи Туг-Атг к расщепляющему действию аминокислоты, что является важным для функциональной активности молекулы.

Ключевые слова: некиоторфин, пространственная структура, конформация, молекулярная механика, молекулярная динамика.

INVESTIGATION OF SPATIAL STRUCTURE OF NEOKYOTORPHIN

Akverdieva G.A.

Institute for Physical Problems, Baku State University

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

e-mail: hagverdigu@baku.edu.az

Abstract. The spatial structure of neokyotorphin have been investigated within molecular mechanics framework and detailed by molecular dynamics simulations. The energy and geometrical parameters of the optimal structures of peptide are obtained. It is found that the spatial structure of neokyotorphin can be described by a set of low-energy states that are in a conformational equilibrium under aqueous environment, the spiral and semifolded conformations correspond to the most stable states of this molecule. It was revealed that the N-terminal tripeptide segment of the molecule is characterized by a high level of mobility, in contrast to its the C-terminal dipeptide segment, folded structure of which is maintained throughout the simulation stage. The conformational rigidity and orientation of side chain of the mentioned dipeptide segment play the shielding role in maintaining of the stability of Tyr-Arg chemical bond to degradation action of aminopeptidases that is important for the functional activity of the molecule.

Keywords: neokyotorphin, spatial structure, conformation, molecular mechanics, molecular dynamics.

Неокиоторфин (H-Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg-OH) является фрагментом 137-141 α -цепи гемоглобина, выделяется эритроцитами в супернатант первичной культуры красных кровяных клеток [1]. Он обнаружен в различных органах человека: в легких, в сердце, в тканях мозга, в лизате эритроцитов. Неокиоторфин является хорошо исследованным физиологически активным пептидом, показывающим высокую активность во многих биотестах – проявляет налаксон зависимый анальгетический эффект и антибактериальную активность, регулирует зимнюю спячку животных, повышает потенциальную зависимость потока ионов Ca^{2+} кардиоцитов лягушки. Установлено, что неокиоторфин проявляет также нежелательное воздействие на организм человека, способствуя размножению опухолевых клеток: лабораторные данные показали, что неокиоторфин и его фрагмент 1-4 участвуют в процессе роста клеток карциномы L 929 в организме человека [2]. Таким образом, неокиоторфин полифункционален, что связано с его конформационными особенностями. Поэтому исследование конформационных свойств неокиоторфина является основой для целенаправленного синтеза его аналогов с избирательным действием, не имеющих побочных эффектов. В настоящее время почти отсутствуют работы, касающиеся конформационных аспектов данной молекулы.

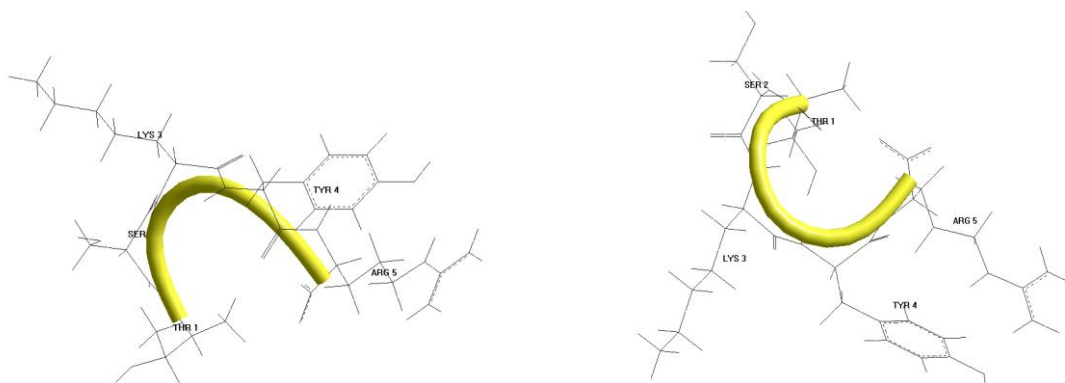
В представленной работе методами молекулярной механики и молекулярной динамики изучены конформационно-динамические свойства неокиоторфина. Конформационные профили молекулы были изучены с использованием написанной на алгоритмическом языке ФОРТРАН программы [3] в рамках механической модели, как описано в работе [4]. Конформационная энергия вычислялась как сумма энергий невалентных, электростатических взаимодействий, а также энергий торсионных барьеров и водородных связей. Отсчет двугранных углов вращения проводился согласно стандартной номенклатуре IUPAC-IUB [5]. Поэтапный расчет пространственной структуры неокиоторфина включал изучение конформационных состояний последовательно наращиваемых фрагментов. Варьированием двугранных углов были проминимизированы свыше 250 конформаций молекулы. Геометрические параметры оптимальных конформаций, относительная энергия которых изменяется в интервале 0-5 ккал/моль, приведены в таблице. Установлено, что спиральные или полусвернутые (спирализующиеся начиная с N- или C-конца пептидной цепи молекулы) конформации отвечают наиболее стабильным состояниям пептидной молекулы. В структурах указанного типа положительно заряженные боковые цепи аминокислотных остатков лизина и аргинина пространственно удалены друг от друга, а отрицательно заряженная карбоксильная группа C-конца молекулы, занимая центральное относительно них пространственное расположение, служит центром электростатической стабилизации; аминокислотные остатки, содержащие гидроксильные группы, располагаясь на периферии молекулы, способны участвовать в установлении водородных связей с молекулами окружающей среды.

Анализ вкладов межостаточных взаимодействий в низкоэнергетических конформациях показал, что дипептидные взаимодействия Tyr4-Arg5 вносят заметный вклад (от -5.7 до -6.6 ккал/моль) в стабилизацию пространственной структуры неокиоторфина. 80% структур исследуемой молекулы содержат свернутую форму указанного C-концевого дипептидного участка с определенной ориентацией боковых цепей остатков и отличаются конформационными состояниями фрагмента Thr1-Lys3. Несущие положительный заряд остатки лизина и аргинина реализуют различные конформационные состояния при формировании структуры молекулы. Эти остатки могут находиться как в R, так и в B-областях конформационного пространства. Выявлено, что основными силами, стабилизирующими данную последовательность, являются взаимодействия Thr1 и Tyr4 с Arg5. В глобальной конформации неокиоторфина, имеющей спиральную форму основной цепи, значения указанных взаимодействий составляют, соответственно, -7.4 и -6.3 ккал/моль. В полусвернутой конформации с относительной энергией 0.2 ккал/моль эти взаимодействия имеют значения -9.3 и -6.6 ккал/моль. Поскольку в указанных оптимальных конформациях большинство аминокислотных остатков имеют свернутые формы основной цепи, основными стабилизирующими силами здесь являются дисперсионные контакты, а также водородные связи между боковыми цепями аминокислотных остатков. Эффективное пентапептидное взаимодействие, имеющее место в указанных структурах, приводит к сближенности концевых участков молекулы: расстояние между концевыми тяжелыми атомами, а именно между N-атомом аминогруппы и O-атомом карбоксильной группы составляет 2.8Å. Несмотря на различие рассмотренных конформаций, их

характеризует компактность молекулярной структуры и сближение противоположно заряженных концевых участков с образованием солевого мостика между карбонильной и аминной группами. Стереорезультаты вышеупомянутых двух конформаций показаны на рисунке 1.

Таблица 1 – Геометрические параметры (в градусах) низкоэнергетических конформациях некиоторфина

Аминокислотный остаток	Двугранные углы	$E_{отн.}=0.0$ ккал/моль	$E_{отн.}=0.2$ ккал/моль	$E_{отн.}=2.8$ ккал/моль	$E_{nis}=3.5$ ккал/моль	$E_{отн.}=4.8$ ккал/моль
Thr1	φ	-34.157	-177.231	-34.285	-169.037	-169.439
	χ_1	52.725	-58.701	52.995	-58.830	-57.467
	χ_2	-176.165	178.560	-176.300	179.004	177.914
	χ_3	173.992	174.544	173.993	175.331	175.306
	ψ	-73.981	131.566	-75.761	135.222	138.026
	ω	180.000	179.874	176.363	175.984	176.656
	Ser2	φ	-93.869	-81.340	-93.071	-89.296
χ_1		55.766	-58.924	55.708	55.951	56.027
χ_2		179.478	179.983	179.480	179.397	179.370
ψ		-65.485	55.385	-66.865	-67.486	-62.184
ω		-174.873	172.432	174.844	180.000	178.055
Lys3		φ	-106.125	-130.608	-105.758	-112.891
	χ_1	-59.633	178.926	-59.643	-59.485	-59.500
	χ_2	-179.000	178.230	-179.000	-179.000	-179.000
	χ_3	179.396	179.610	179.407	179.590	179.481
	χ_4	180.000	179.678	180.000	180.000	180.000
	χ_5	179.750	179.734	179.751	179.752	179.752
	ψ	-61.420	-63.854	-63.684	-65.193	100.593
	ω	-170.845	175.142	176.715	-175.628	-178.340
	Tyr4	φ	-106.001	-110.743	-95.743	-107.676
χ_1		-175.629	170.758	177.659	172.351	-177.178
χ_2		61.895	62.579	79.754	67.054	62.761
χ_3		178.570	179.671	180.000	179.640	178.744
ψ		135.204	-61.525	149.517	-62.187	133.418
ω		-179.000	179.792	179.044	177.678	-179.000
Arg5		φ	44.160	-134.131	-121.646	-132.959
	χ_1	-68.536	-67.551	-179.000	-69.970	-65.922
	χ_2	-179.000	-74.840	178.962	-75.336	179.935
	χ_3	176.619	-177.468	178.730	-176.274	177.908
	χ_4	179.400	180.000	180.000	180.000	179.486
	ψ	67.325	-52.299	-53.796	-53.267	67.449



3)

(b)

Рисунок 1 – Стереорезультаты двух оптимальных структур некиоторфина ((a) - глобальная конформация, (b) – конформация с $E_{отн.}=0.2$ ккал/моль)

В исследованиях некиоторфина методом молекулярной динамики (МД) [6] в процессе симуляции

температура системы поддерживалась постоянной (300K) с помощью алгоритма Берендсена со временем релаксации термостата 0,2 пс [7]. Шаг интегрирования ньютоновских уравнений движения был выбран равным 1 фемтосекунде. Сольватация системы была проведена при помощи процедуры сольватации моделью TIP4P воды в заданном сферическом объеме. Для имитации молекулярной динамики неокиоторфина была использована геометрия оптимальных конформационных состояний молекулы. Анализ результатов исследования проводился на основе трехмерных изображений молекулы, количественной оценки полной внутримолекулярной энергии и оценки пределов изменения двугранных углов вращения вокруг одинарных связей основной цепи и межатомных расстояний между функционально важными аминокислотными остатками в процессе моделирования. Установлено, что в оптимальных структурах неокиоторфина сохраняются невалентные взаимодействия между аминокислотными остатками в первом и пятом положениях пептидной цепи, о чем свидетельствуют расстояния между C^{α} -атомами указанных остатков, количественная оценка которой не превышает 5 Å. За время симуляции сохраняются водородные связи между функционально активными группами остатков как друг с другом, так и с основной цепью. Отметим, что поведение отдельных участков молекулы в процессе моделирования отражает динамику их взаимодействия друг с другом и зависит от расположения и природы близлежащих аминокислотных остатков. Так, наблюдаются конформационные изменения N-концевого трипептидного участка, однако эти изменения являются кратковременными и обратимыми. Так, установлено, что за время моделирования происходит сближение остатка Ser2 с боковой цепью Lys3. Расчет межатомных расстояний между этими остатками показывает их сближение до 2Å, в результате которого происходит образование водородной связи между OG боковой цепи Ser2 и NH группой основной цепи Lys3. C-концевой дипептидный участок молекулы демонстрирует конформационную жесткость основной цепи составляющих остатков, о чем свидетельствуют незначительные изменения двугранных углов пептидного скелета данного участка, лишь боковые цепи составляющих его аминокислотных остатков проявляют определенную динамику. Боковая цепь Thr4 в отличие от Arg5 лабильна, что важно для установления водородных связей гидроксильной группы данного остатка с молекулами растворителя.

Таким образом, пространственное строение неокиоторфина в условиях водного окружения может быть описано набором низкоэнергетических состояний, находящихся в конформационном равновесии. Можно предположить, что в зависимости от окружающей среды может реализовываться та или иная конформация или же несколько конформаций данной молекулы. N-концевой трипептид Thr1-Lys3 молекулы конформационно лабилен, а боковые цепи составляющих его аминокислотных остатков ориентированы в окружающую среду и могут участвовать в образовании водородных связей с молекулами растворителя, в то время как C-концевой дипептидный участок Thr4-Arg5 молекулы характеризуется конформационной жесткостью и определенной ориентацией боковых цепей, что играет экранирующую роль в сохранении устойчивости соответствующей химической связи к расщепляющему действию аминопептидаз и является важным для функциональной активности. Полученные результаты представляют интерес для изучения механизма действия неокиоторфина на атомно-молекулярном уровне и могут быть использованы при синтезе его искусственных аналогов селективного и пролонгированного действия, лишенных побочных нежелательных воздействий на организм человека.

Список литературы / References:

1. Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V., Miloudi K., Daoud R, Krier F., Kouach M., Briand G., Guillochon D. Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides*, 2006, vol. 27, pp. 2082-2089.
2. Sazonova O.V., Blishchenko E.Yu., Njlmazova A.G. [et al.] Stimulation of fibroblast proliferation by neokyotorphin requires Ca^{2+} influx and activation of PKA, CaMK II and MAPK/ERK. *FEBS Journal*, 2007, vol. 274, Iss. 2, pp. 474-484.
3. Годжаев Н.М., Максумов И.С., Исмаилова Л.И. Программа полуэмпирического расчета конформаций молекулярных комплексов. *Журнал структурной химии*, 1983, № 24, с. 147-148. [Godjajev N.M., Maksumov I.S., Ismailova L.I. Programm of semiempirical calculations of conformations of molecular complexes. *Jurnal strukturnoy himii*, 1983, no. 24, pp. 147-148. (In Russ.)]
4. Akverdieva G.A., Godjajev N.M., Akyuz S. A Molecular Mechanics Conformational Study of Peptide T. *J. Mol. Struct.*, 1997, vol. 403, pp. 95-110.
5. IUPAC-IUB, Quantity, Units and Symbols in Physical Chemistry. *Blackwell Scientific Publications. Oxford*, 1988, vol. 39.
6. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R. *J. Chem. Phys.*, 1984. vol. 81, pp. 3684-3690.