

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ КОНФОРМАЦИИ МЕЛАНОТРОПИНОВ

Ахвердиева Г.А.

Институт физических проблем, Бакинский Государственный Университет

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

e-mail: hagverdignara@gmail.com

Аннотация. Проведен сравнительный анализ пространственных структур β - и γ -меланотропинов, стимулирующих физиологические и морфологические изменения окраски кожи и волос. Методами молекулярной механики, молекулярной динамики, квантовой химии с применением современных компьютерных программ выявлены конформационно-электронные особенности, характеризующие пространственную структуру этих пептидов. На основе полученных результатов и данных структурно-функциональной исследований оценена биологически активная конформация меланотропинов. Выявлено, что устойчивость пространственной структуры меланотропинов определяется взаимным расположением фармакофорных элементов: ароматических колец боковых цепей тирозина, фенилаланина и триптофана и заряженной гуанидиновой группы аргинина и характеризуется специфическим распределением электронной плотности электронов, что играет важную роль при взаимодействии с рецептором. Конформационно-электронное сходство «общего фрагмента» позволяют сделать вывод, что спиральная структура тетрапептидного фрагмента His-Phe-Arg-Trp меланотропинов обеспечивает специфику меланотропин-рецепторного взаимодействия.

Ключевые слова: меланотропины, биоактивная конформация, структурно-функциональная взаимосвязью.

INSIGHTS INTO BIOACTIVE CONFORMATION OF MELANOTROPINS

Akverdieva G.A.

Institute for Physical Problems, Baku State University

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

e-mail: hagverdignara@gmail.com

Abstract. The comparative analysis of spatial structure of β - and γ -melanotropins, which stimulate physiological and morphological changes of skin and hair coloration, have been conducted. By the molecular mechanics, molecular dynamics, quantum chemical methods and modern computer programs the conformational-electronic peculiarities characterized the spatial structure of these peptides are revealed. On the basis received results and data of the structure-functional investigations the biologically active conformation of melanotropins was assessed. It was found the stability of spatial structure of melanotropins is defined by mutual arrangement of pharmacophore elements: the aromatic rings the side chains of the tyrosine, phenylalanine and triptofan residues and charged ganidine group of Arg and characterized by a specific distribution of electron density, that plays an important role in the interaction with the receptor. The conformational-electron similarity of the "common fragment" suggests that the helical structure of the His-Phe-Arg-Trp tetrapeptide fragment of melanotropins provides the specificity of melanotropin-receptor.

Key words: melanotropins, bioactive conformations, structure-function relationships.

β -меланотропин (H-Asp1-Ser2-Gly3-Pro4-Tyr5-Lys6-Met7-Glu8-His9-Phe10-Arg11-Trp12-Gly13-Ser14-Pro15-Pro16-Lys17-Asp18-OH) и γ -меланотропин (H-Tyr1-Val2-Met3-Gly4-His5-Phe6-Arg7-Trp8-Asp9-Arg10-Phe11-Gly12-OH) – пептиды, выделяющиеся в гипофизе и в других клетках, стимулирующие физиологические и морфологические изменения окраски кожи и волос [1-3].

В представленной работе с использованием молекулярного моделирования проведен сравнительный конформационный анализ β - и γ -меланотропинов, выявлены конформационно-электронные особенности, характеризующие пространственную структуру этих пептидов. На основании полученных результатов и данных структурно-функциональной исследований оценены биологически активные конформации меланотропинов.

Конформационные профили молекул были изучены с использованием программы расчета конформационной энергии пептидов [4], разработанной на принципах матричного метода Германса и Ферро [5]. Исследования проводились в рамках механической модели. Конформационная энергия вычислялась как сумма энергий невалентных, электростатических взаимодействий, а также энергий торсионных барьеров и водородных связей. Предполагалась жесткая валентная схема молекулы, а именно, поиски проводились только по углам вращения ϕ , ψ , ω основной и χ боковых цепей. Форма основной цепи описываемая “шейпом” обозначается символами e and f , соответствующих развернутой и свернутой конфигурациям виртуальной связи $C^{\alpha}_{i-1}-C^{\alpha}_{i+1}-C^{\alpha}_{i+2}-C^{\alpha}_{i+3}$. Отсчет двугранных углов вращения проводился согласно стандартной номенклатуре IUPAC-IUB [6]. Поэтапный расчет пространственной структуры молекул включал изучение конформационных состояний последовательно наращиваемых фрагментов. Молекулярная динамика пептидов проводилась с использованием силового поля AMBER в температурном интервале 293-313K с шагом 5K в течение 10 нс [7]. Использовалась процедура сольватации с применением модели воды в заданном сферическом объеме TIP4P [8]. Квантово-химические расчеты молекул проводились методом CNDO [9].

На первом этапе на основе низкоэнергетических состояний монопептидов были изучены конформационные возможности активного аналога H-His-Phe-Arg-Trp-OH, последовательность которого соответствует фармакофору меланотропинов. Обнаружено, что низкоэнергетические конформации этой молекулы характеризуются либо

спиральной формой тетрапептидного скелета, либо β -поворотом на дипептидном сегменте Arg-Trp. В этих структурах положительно заряженные атомы боковой цепи Arg и отрицательно заряженная С-концевая карбоксильная группа пространственно сближаются, что сопровождается эффективными электростатическими контактами и образованием водородных связей. Невалентные взаимодействия боковых цепей остатков Phe и Trp вносят основной вклад в конформационную энергию этой молекулы.

Поэтапный расчет пространственной структуры меланотропинов включал изучение конформационных состояний последовательно наращиваемых фрагментов и основывался на универсальном наборе низкоэнергетических состояний свободных аминокислот. Разбиение молекул на фрагменты является чисто технической процедурой и не влияет на финишный набор низкоэнергетических конформаций. В результате из большого количества анализируемых комбинаций предпочтительных состояний фрагментов был выделен ограниченный набор низкоэнергетических конформаций, которые моделируют возможные структуры исследуемых молекул. Установлено, что наиболее вероятные девять структур β -меланотропина имеют относительные энергии в достаточно широком интервале 0-12.0 ккал / моль. Можно выделить три группы, в которых объединены родственные конформации данной молекулы, стабилизирующиеся схожими взаимодействиями и имеющими близкие значения двугранных углов аминокислотных остатков. Отметим, что каждая группа характеризуется определенным шейпом основной цепи центрального сегмента Met7-Trp12: fffef, ffeff и fffff соответственно. В конформациях первой и второй групп фармакофорный участок His-Phe-Arg-Trp характеризуется β -поворотом на сегменте Arg-Trp. Особый интерес представляют конформации третьей группы, в которых аминокислоты фрагмента Met7 -Trp12 формируют спиральную конформацию. Можно отметить, что в предпочтительных структурах этой группы центральный участок, N- и С-концевые участки молекулы сближены в пространстве. Оптимальная конформация данной группы имеет относительную энергию, равную 4.2 ккал/моль. Значения внутри- и межостаточных дисперсионных взаимодействий, а также электростатических и торсионных взаимодействий указывают на альтернативный характер стабилизации различных низкоэнергетических структур. Так, в глобальной конформации молекулы энергия дисперсионных контактов между остатками на 5.0 ккал/моль ниже, чем в следующей низкоэнергетической структуре с относительной энергией, равной 0.5 ккал/моль. Данное обстоятельство обеспечивает чувствительность конформационного равновесия к внешним факторам, сдвигая его ко второй структуре при переходе из полярной среды в более гидрофобную. Конформация, уступающая глобальной структуре на 8.7 ккал/моль, является малоперспективной с первого взгляда. Высокая энергия этой структуры обусловлена сравнительно небольшим вкладом межостаточных электростатических взаимодействий. Однако эта конформация характеризуется благоприятными дисперсионными контактами, и поэтому можно ожидать, что она станет наиболее предпочтительной в сильнополярной среде, в которой электростатические взаимодействия не играют существенной роли. Отметим, что остатки Phe и Trp эффективно взаимодействуют как друг с другом, так и с остальными аминокислотными остатками данной последовательности. В предпочтительных конформациях этой молекулы между положительно заряженными атомными группами остатков Lys6, Arg11, Lys17 и отрицательно заряженными атомами боковой цепи остатка Glu8 реализуются эффективные электростатические взаимодействия, немалый вклад в стабилизацию данной последовательности вносят также взаимодействия концевых амино- и карбоксильной групп с заряженными остатками молекулы. Такие структуры стабилизируются также интенсивными дисперсионными контактами основных атомов и характеризуются компактностью пространственной структуры, о чем свидетельствуют значения расстояний между тяжелыми атомами. Кроме того, эти структуры стабилизируются также водородными связями между атомами основной цепи.

Результаты расчетов показывают, что γ -меланотропин не имеет четкой фиксированной трехмерной структуры, но она реализуется с помощью ограниченного числа состояний, находящихся в конформационном равновесии. Так, наиболее вероятные 14 структур γ -меланотропина имеют относительную энергию в интервале 0-10 ккал/моль. Расчеты показывают, что стабильность пространственной структуры молекулы пептида определяется взаимным расположением ароматических боковых цепей остатков Phe6, Trp8 и заряженных групп остатков Arg7, Asp9, Arg10. Выявлено, что фрагмент Tyr1-Gly4 этого пептида является конформационно гибким, а для фрагмента His5-Arg10 характерна конформационно-жесткая нуклеация. Глобальная и четыре родственные конформации данного пептида содержат α -спираль на фрагменте His5-Arg10 (fffff-shape). В этих структурах центральный и С-концевой участки молекулы сближены в пространстве. В низкоэнергетической структуре с относительной энергией, равной 3.6 ккал/моль и 15 родственных конформациях фрагменты Tyr1-Gly4 и Phe6-Phe11, имеющие спиральные структуры смещены друг относительно друга благодаря повороту на сегменте His5-Phe6. Поэтому форма основной цепи фрагмента His5-Arg10 принадлежит effff шейпу пептидного скелета. Как видим из представленных результатов, устойчивость пространственной структуры меланотропинов определяется взаимным расположением фармакофорных элементов

На следующем этапе исследования установленные низкоэнергетические конформации меланотропинов были подвергнуты моделированию молекулярной динамики. В результате были определены пределы изменения двугранных углов и расстояний между атомами аминокислотных остатков. Результаты молекулярной динамики демонстрируют конформационную жесткость пептидного скелета тетрапептидного фрагмента His-Phe-Arg-Trp. Количественная оценка расстояний между атомами показывает, что при моделировании упомянутая часть молекул сохраняет спиральную форму, структура этой части молекул после окончания процесса моделирования практически не отличается от начальной его стадии. За время симуляции дисперсионные контакты между атомами основной цепи аминокислотных остатков His и Trp остаются неизменными, расстояние между C^α -атомами указанных остатков не превышает 12Å. Можно предположить, что жесткость пептидного остова указанного фрагмента играет важную роль в функциональной активности молекул меланотропинов и определяет специфику их взаимодействия с рецептором.

Показано, что ароматические боковые цепи остатков Phe и Trp конформационно подвижны из-за локализации на поверхности молекул пептидов и поэтому могут находиться в специфических ориентациях, благоприятных для взаимодействия с рецептором. Обнаружено, что амплитуда колебаний атомов этих остатков в водной среде уменьшается. Можно предположить, что при взаимодействии с рецептором боковые цепи этих остатков освободившись от молекул воды, способны участвовать в межмолекулярных контактах в роли субстрата. Это предположение подтверждается работой [10], в которой предлагается, что ароматические группы этих остатков могут участвовать в качестве донора или акцептора при образовании водородной связи с менее кислотными гидроксильными группами рецептора. Проведенная в работе [11] топография фармакофора выявила важность индольного кольца боковой цепи остатка Trp при взаимодействии с рецептором MC1 меланокортин. Отметим, что боковая цепь остатка Arg центрального тетрапептида показала некоторую динамику в процессе моделирования, что позволяет ей, по-видимому, участвовать в селективности рецепторов этих молекул. Это предположение подтверждается работой [12], в которой указывается на то, что этот положительно заряженный остаток может участвовать в электростатических взаимодействиях с отрицательными заряженными остатками Asp или Glu (при мутации) рецептора MC2 меланокортин.

Биоактивные конформации β - и γ -меланотропинов оценивались сравнительным анализом низкоэнергетических конформаций меланотропинов и их активного аналога H-His-Phe-Arg-Trp-OH. Было сравнено подмножество конформаций, общих для этих пептидов. Сравнение проводилось наложением остатков фармакофора -His-Phe-Arg-Trp- меланотропинов и указанного активного аналога. Были вычислены значения величин среднеквадратичных отклонений сравниваемых структур. Установлено, что указанная величина равна 0.82 Å, и 0.79 Å, соответственно при наложении остатков 9-12 β -меланотропина и остатков 5-8 γ -меланотропина с активным аналогом. Выявлено, что спиральная конформация молекулы H-His-Phe-Arg-Trp-OH реализуется в биоактивных конформациях меланотропинов. Этим структурам присущи общие свойства: они стабилизируются водородной связью между карбонильной группой остатка His и аминогруппой остатка Trp; боковая цепь положительно заряженного остатка Arg указанного тетрапептидного фрагмента молекул обладает определенной конформационной подвижностью. На рисунке 1 показано наложение предполагаемых биоактивных конформаций β - и γ -меланотропинов. Ниже в таблице 1 приведены двугранные углы этих конформаций.

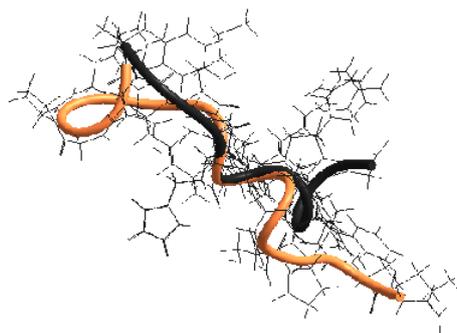


Рисунок 1 – Наложение предполагаемых биоактивных конформаций β -меланотропина (в оранжевом цвете) и γ -меланотропина (в черном цвете)

Таблица 1 – Двугранные углы основной цепи (в градусах) биоактивных конформаций β - и γ -меланотропинов

β - меланотропин				γ - меланотропин			
Остатки	ϕ	ψ	ω	Остатки	ϕ	ψ	ω
Asp1	-71	151	-179				
Ser2	-57	131	-178				
Gly3	127	-85	168				
Pro4	-60	-43	174				
Tyr5	-108	143	-173	Tyr1	-107	141	176
Lys6	-100	119	178	Val2	-123	-71	180
Met7	-135	-53	175	Met3	-133	168	179
Glu8	-86	-31	-169	Gly4	-80	61	180
His9	-67	-38	-177	His5	-57	-37	174
Phe10	-78	-50	-168	Phe6	-80	-45	-151
Arg11	-80	-40	-176	Arg7	-65	-40	-178
Trp12	-99	-48	-174	Trp8	-88	-40	-170
Gly13	-70	-49	-179	Asp9	-77	-49	-180
Ser14	-97	136	176	Arg10	-83	-67	-164
Pro15	-60	135	177	Phe11	-77	-46	-173
Pro16	-60	-57	178	Gly12	90	89	-
Lys17	-121	-67	-179				
Asp18	-122	158	-				

Были выявлены также конформационно-электронные особенности, которые важны для функциональной активности исследуемых пептидов. Так установлено, что биоактивные конформации меланотропинов характеризуются специфическим распределением электронной плотности, что отражается на значениях эффективных зарядов атомов функциональных остатков. Было обнаружено, что распределение зарядов на атомах фармакофорных элементов (боковых цепей остатков тирозина, фенилаланина, триптофана и заряженной гуанидиновой группы остатка Arg) молекулы N-His-Phe-Arg-Trp-OH и соответствующего фрагмента His-Phe-Arg-Trp в биоактивных конформациях исследуемых молекул аналогичны. Наблюдаемые различия в значениях зарядов на определенных группах атомов как основной, так и боковых цепей остатков молекул продиктованы спецификой их относительного расположения в каждой молекуле. Было обнаружено, что электронная структура биологически активных конформаций молекул характеризуется значительно более низким дипольным моментом при сравнении с другими структурами, что объясняется более равномерным распределением электронной плотности в них.

Конформационно-электронное сходство «общего фрагмента» His-Phe-Arg-Trp меланотропинов позволяют сделать вывод, что спиральная структура указанного тетрапептида обеспечивает специфику меланотропин-рецепторного взаимодействия. Можно предположить, что механизм связывания молекул меланотропинов с рецептором заключается в образовании гидрофобных взаимодействий ароматических колец и установлении электростатических контактов с участием ионизируемых функциональных групп этих молекул.

Полученные структурные данные представляют интерес для изучения механизма физиологического эффекта меланотропинов и могут быть использованы при разработке новых искусственных аналогов.

Список литературы / References:

1. Kastin A.J. Handbook of Biologically Active Peptides. *Academic Press*, 2013, pp. 838-844.
2. Jakubke H.-D., Sewald N. *Peptides from A to Z: A Concise Encyclopedia*. John Wiley & Sons, 2008, 216 p.
3. Rousseau K., Kausser S., Pritchard L.E. [et.al] Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/ melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis. *FASEB. J.* 2007, vol. 21, no. 8, pp.1844-1856.
4. Годжаев Н.М., Максумов И.С., Исмаилова Л.И. Программа полуэмпирического расчета конформаций молекулярных комплексов. *Журнал структурной химии*, 1983, № 24, с. 147-148. [Godjayev N.M., Maksumov I.S., Ismailova L.I. Program of semiempirical calculations of conformations of molecular complexes. *Jurnal strukturnoy himii*, 1983, no. 24, pp 147-148 (In Russ.)]
5. Hermans J., Ferro D. Representation of a protein molecule as a tree and application to modular computer programs which calculate and modify atomic coordinates. *Biopolymers*, 1971, vol. 10, pp. 1121-1129.
6. IUPAC-IUB. Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry. *Blackwell Scientific, Oxford*, 1993, 168 p.
7. Шайтан К.В., Сарайкин С.С. *Метод молекулярной динамики*, 1999, <http://www.moldyn.ru>. [Shaitan K.V., Saraykin S.S. *Metod molekulyarnoy dinamiki*, 1999. <http://www.moldyn.ru> (In Russ.)].
8. Horn H.W., Swope W.C., Pitera J.W. [et al.] Development of an improved four-site water model for biomolecular simulations: TIP4P-Ew. *J. Chem. Phys.*, 2004, vol. 120, pp. 9665-9678.
9. Allinger N.L., Yuh Y. *QCPE 395, Quantum chemistry program exchange*. Indiana Univ., Indiana, 1982.
10. Hruby V.J. Truncation studies of α -melanotropin peptides identify tripeptide analogues exhibiting prolonged agonist bioactivity. *Peptides*, 1996, vol. 17, pp. 995-1002.
11. Haskell-Luevano C., Boteju L.W., Miwa H., Dickinson C. Topographical modification of melanotropin peptide analogues with β -methyltryptophan isomers at position 9 leads to differential potencies and prolonged biological activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1993, vol. 38, pp. 4720-4729.
12. Asai M., Ramachandrapa S., Joachim M., Shen Y. [et al.] Loss of function of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 is associated with mammalian obesity. *Science*, 2013, vol. 341, pp. 275-278.