

УДК 547.962:541.63

КОНФОРМАЦИОННЫЕ СОСТОЯНИЯ СОЕДИНЕНИЙ СЕМЕЙСТВА ГАЛЛАТОСТАТИНОВ

Л.И. ВЕЛИЕВА, И.Н. АЛИЕВА, Н.М. ГОДЖАЕВ, Д.И. АЛИЕВ

Бакинский Государственный Университет
370145, Баку, ул. З.Халилова 23

Методом атом-атомных потенциальных функций изучено пространственное строение и конформационная подвижность соединений семейства галлатостатинов. На основе количественной оценки энергии межстаточных взаимодействий показано, что функциональные особенности галлатостатинов обусловлены конформационными свойствами и геометрией составляющих молекулу фрагментов.

Введение

Способность биологически активных соединений принимать строго определенные стабильные конформации определяется последовательностью аминокислотных остатков, участвующих в формировании уникальной трехмерной организации молекул. Наряду с экспериментальными методами исследования структуры и физических свойств таких соединений - рентгеноструктурным анализом, методами магнитной и оптической спектроскопии широко используются и теоретические расчетные методы. Вычислительный эксперимент в рамках таких методов позволяет исследовать их пространственное строение на основе физической теории структурной организации пептидов и белков, согласно которой нативная конформация молекул рассматривается как система валентно-несвязанных атомов, обладающая минимальной внутренней энергией и согласованная в отношении внутри- и межстаточных взаимодействий составляющих ее аминокислотных остатков [1-2].

Методом теоретического конформационного анализа изучено пространственное строение природного биологически активного соединения Met-галлатостатина ($\text{Gly}^1\text{-Pro}^2\text{-Pro}^3\text{-Tyr}^4\text{-Asp}^5\text{-Phe}^6\text{-Gly}^7\text{-Met}^8\text{-NH}_2$) и его модифицированных аналогов, образующихся в результате замены пролина во втором и третьем положениях аминокислотной последовательности гидроксипролином ($[\text{Hyp}^2]\text{-}$ и $[\text{Hyp}^3]\text{Met}$ -галлатостатины, соответственно). Такая замена приводит к резкому усилиению ингибиторных свойств [3-5] и повышению устойчивости указанных соединений к действию пептидаз-ферментов, расщепляющих связь $-\text{Pro-Pro}-$ во всех известных регуляторных пептидах [3].

Метод расчета.

В основе метода конформационного анализа лежит процедура минимизации конформационной энергии молекулы и нахождение геометрических параметров, соответствующих ее низкоэнергетическим состояниям [2]. Полная конформационная энергия такой системы представлена в виде аддитивной суммы парных взаимодействий валентно-несвязанных атомов в рамках механической модели атома – невалентных ($E_{\text{n.v.}}$), электростатических ($E_{\text{эл.}}$), торсионных ($E_{\text{тор.}}$) и энергии образования водородной связи ($E_{\text{в.с.}}$). Конформационные состояния исследуемой

молекулы характеризуются двугранными углами вращения основной $\omega(C'-N)$, $\phi(N-C^\alpha)$, $\psi(C^\alpha-C')$ и боковых цепей $\chi(C^\alpha-C^\beta)$, и.т.д.) составляющих ее аминокислотных остатков. Используемая в методе система идентификаторов, включающая понятие форм и шейпов аминокислотных остатков, подробно описана в [1]. Там же приведены низкоэнергетические конформационные состояния N-ацетил- α -аминокислот, на основе которых выбраны начальные приближения в процедуре минимизации полной конформационной энергии молекулы.

На рис.1 приведена расчетная модель молекулы Met-галлатостатина с обозначением всех переменных параметров и схема поэтапного расчета, включающего независимое исследование три- и пентапептидных фрагментов. Такой подход позволяет свести решение полной конформационной задачи к последовательному нахождению геометрических параметров, соответствующих низкоэнергетическим состояниям отдельных фрагментов исследуемой молекулы. Результаты каждого этапа исследований представляют самостоятельный интерес и в конечном итоге позволяют установить набор низкоэнергетических структур для всей молекулы.

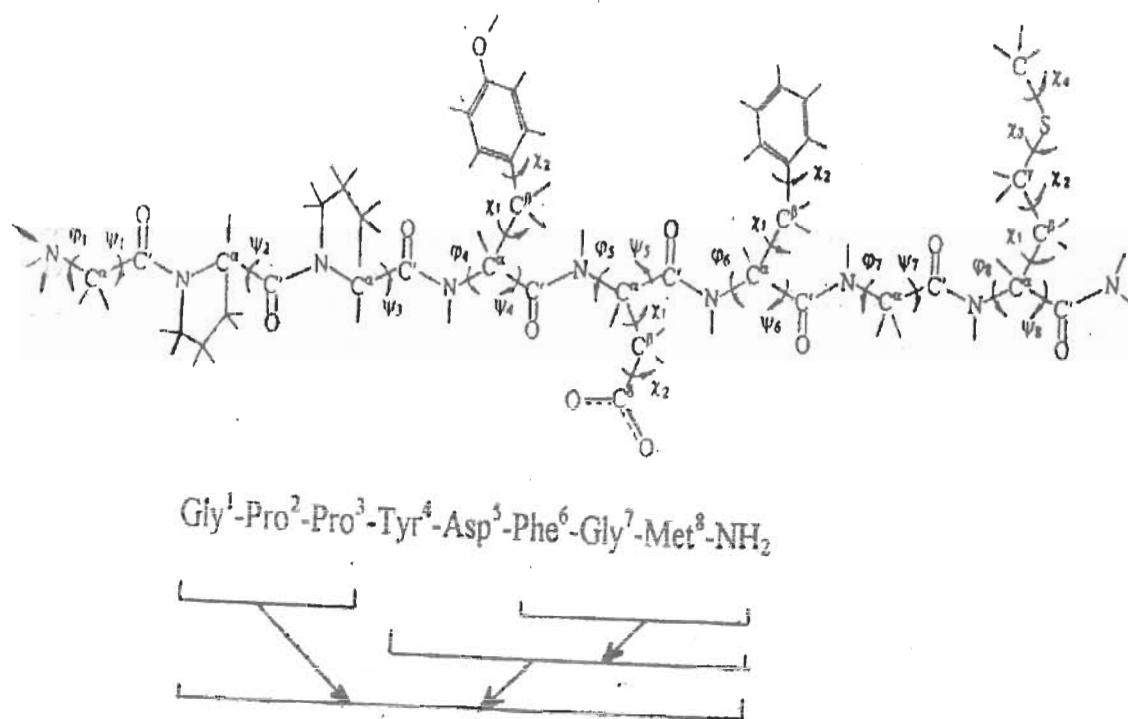


Рис.1
Модель и схема расчета молекулы Met-галлатостатина.

ПЕНТАПЕТИД TYR-ASP-PHE-GLY-MET-NH₂.

Начальные приближения для этого фрагмента, идентичного для всех трех молекул, составлены из стабильных конформаций трипептида Phe⁶-Gly⁷-Met⁸-NH₂ [6] и монопептидов Тир и Асп [2]. Конформационный анализ выполнялся в предположении жесткой валентной схемы молекул галлатостатинов. Длины связей, усредненные значения валентных углов и другие геометрические параметры

составляющих их N-ацетил- α -аминокислот взяты из работы [7]. Всего для минимизации полной конформационной энергии фрагмента составлен 441 структурный вариант, принадлежащий 16 шейпам и 72 формам основной цепи. Конформационные особенности фрагмента обусловлены объемными боковыми цепями остатков Тир⁴, Phe⁶, Met⁸ и заряженной боковой цепью аспарагиновой кислоты Asp⁵. Поэтому наибольшее количество низкоэнергетических конформаций (~20) с относительной энергией 0-5 ккал/моль характеризуется структурой свернутого типа (табл.1), обозначенного шейпами ffff и efff их пептидного остова.

Таблица 1.

Энергетическое распределение конформаций пента- и трипептидных фрагментов молекул Met- галлатостатинов.

№	Шейп	Интервал энергии E _{отн} (ккал/моль)					
		0 - 1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	
Tyr⁴-Asp⁵-Phe⁶-Gly⁷-Met⁸-NH₂							
1.	efff	-	-	-	1	4	28
2.	ffff	-	-	2	6	8	14
3.	eeff	-	1	-	2	5	37
4.	feff	-	-	-	-	-	34
5.	eфе	-	-	1	-	1	11
6.	ffee	1	-	1	1	2	6
7.	eeee	-	-	-	2	2	12
8.	feee	-	-	-	1	1	9
9.	efef	-	-	-	-	-	4
10.	ffef	-	-	-	1	1	1
11.	eefe	-	-	-	-	3	20
12.	fefe	-	-	-	-	1	17
13.	eeef	-	-	-	-	1	7
14.	feef	-	-	-	-	-	8
15.	effe	-	-	-	-	-	4
16.	fffe	-	-	-	-	2	4
Gly¹-Pro²-Pro³							
1.	fe	4	-	-	-	-	-
2.	ee	2	-	2	-	-	-
Gly¹-Hyp²-Pro³							
1.	fe	2	1	9	4	2	2
2.	ee	-	-	3	6	1	7
Gly¹-Pro²-Hyp³							
1.	fe	10	7	-	1	-	-
2.	ee	2	7	3	5	1	-

Такие конформации стабилизированы многочисленными дисперсионными взаимодействиями гидрофобных боковых цепей Тир⁴ и Phe⁶, водородными связями между атомными группами на сближенных N и C концевых остатках исследуемого участка молекулы. Полностью свернутые структуры ~ на 3 ккал/моль уступают самой низкоэнергетической конформации фрагмента, принадлежащей шейпу ffee. Наибольший вклад в общую потенциальную энергию вносят невалентные взаимодействия атомов основной цепи Asp⁵ и боковой цепи Тир⁴ (-3,45 ккал/моль), а

также дисперсионные взаимодействия ароматических колец Түг⁴ и Рхе⁶ (-2,84 ккал/моль). Характерной особенностью таких структур является водородная связь между карбонильным кислородом Түг⁴ и амидным водородом Мет⁸, вклад от энергии образования которой составил -1,4 ккал/моль. Конформации с L формами основной цепи Түг⁴ и Асп⁵ обладают большей энергией и остаются за пределами выбранного энергетического интервала. Полусвернутые формы основной цепи, представленные шейпом eeff, характеризуются 8 конформационными состояниями с относительной энергией 0-5 ккал/моль. Отличительная особенность структур этого типа -- выгодные дисперсионные взаимодействия аминокислотных остатков Түг⁴ и Рхе⁶, обусловленные параллельным расположением их ароматических колец, расстояние между С атомами которых составляет ~ 2,6 Å. Этот фактор обеспечивает максимальный вклад от энергии их дисперсионных взаимодействий, равный -4,67 ккал/моль. Полнотью вытянутые структуры фрагмента, принадлежащие шейпу eeee, также как и представители других шейпов энергетически менее предпочтительны. Однако выводы о роли этих структур в формировании пространственной организации молекул Мет галлатостатинов можно сделать на основе конформационного анализа всей молекулы. Поэтому низкоэнергетические представители всех рассмотренных форм и шейпов основной цепи были включены в дальнейшие расчеты.

ТРИПЕПТИДЫ GLY-PRO-PRO, GLY-HYP-PRO И GLY-PRO-HYP.

Пролин и оксипролин представлены двумя формами основной цепи R и B, а у концевого остатка Gly R и L формы эквивалентны B и P формам соответственно, поэтому исходный набор структурных вариантов, принадлежащих 4 шейпам и 16 формам основной цепи трипептида, включал 12 конформаций для фрагмента Gly¹-Pro²-Pro³ и 70 - для Gly¹-Hyp²-Pro³ и Gly¹-Pro²-Hyp³ (с варьируемым углом χ боковой цепи гидроксипролина). Замена в третьем положении аминокислотной последовательности пролина его гидроксилированным аналогом не сопровождается изменением иерархии конформационных состояний трипептида. В обоих случаях энергетически выгодными являются полусвернутые формы основной цепи, представленные шейпом fe. Такая же замена во втором положении трипептидной последовательности приводит к уменьшению числа низкоэнергетических конформационных состояний фрагмента молекулы [Hyp²]Met-галлатостатина (табл. I). Качественная оценка вкладов межстаточных взаимодействий показала, что у фрагмента Gly¹-Hyp²-Pro³ с разветвленной формой основной цепи (шейп ee) отсутствуют какие-либо взаимодействия между первым и третьим остатками, а взаимодействия атомов Gly¹ с боковой цепью Hyp², точнее с метиленовыми группами плоского пролинового цикла имеют дестабилизирующий характер. Поэтому такие конформации маловероятны в структуре [Hyp²]Met-галлатостатина. В предпочтительных конформациях исследуемых трипептидов с свернутыми формами основной цепи (шейп fe) реализация дополнительных стабилизирующих взаимодействий осуществляется без значительного ослабления контактов в пределах дипептидных взаимодействий и заметного изменения их геометрических параметров. Вклады от межстаточных взаимодействий Pro² с Pro³ в таких структурах составляют -3.7 ккал/моль, Pro² с Hyp³ - 0.8 ккал/моль, а Hyp² с Pro³ - 4.5 ккал/моль. Дополнительным стабилизирующим фактором в низкоэнергетических конформациях фрагментов Gly¹-Pro²-Pro³ и Gly¹-Pro²-Hyp³ являются также взаимодействия между Gly¹ и Pro² (- 2.9 и - 3.0 ккал/моль, соответственно). Таким образом, различие в пространственной организации исследуемых фрагментов

связана не с геометрией предпочтительных структур, а с их конформационными особенностями.

[HYP²]-, [HYP³]- И МЕТ-ГАЛЛАТОСТАТИНЫ.

Результаты фрагментарного анализа были положены в основу расчета структуры всей молекулы Met-глутататина и его аналогов. В табл.2 приведены низкоэнергетические конформации молекул Met-глутататинов и величины энергетических вкладов в конформационную энергию от невалентных (включающих водородные связи), электростатических и торсионных взаимодействий.

Таблица 2. Низкоэнергетические конформации молекул Met-глутататинов.

Шейп	Конформация	Энергетические вклады (ккал/моль)				
		E _{н.в.}	E _{эл.с.}	E _{тор.}	E _{пол.}	E _{отн.}
Met-глутататин						
fefefff 	PBRB ₁ R ₁ B ₃ PR ₃₂₂₂	-31.19	-1.07	3.77	-28.49	0.26
	RBRB ₁ R ₁ B ₃ PR ₃₂₂₂	-31.19	-0.70	4.46	-27.43	1.32
	PBRB ₃ R ₁ R ₃ RR ₂₂₂₂	-28.70	-0.44	2.27	-26.88	1.87
	PBRB ₃ R ₂ B ₃ PR ₃₂₂₂	-27.62	-0.69	1.69	-26.62	2.13
[HYP²] Met-глутататин						
fefefff 	RBRB ₁ R ₁ B ₃ PR ₃₂₂₂	-36.64	3.61	4.28	-28.75	0.00
	PBRB ₁ R ₁ B ₃ PR ₃₂₂₂	-35.53	3.41	3.75	-28.37	0.38
	PBRB ₃ R ₁ R ₃ RR ₂₂₂₂	-31.76	4.55	2.20	-25.01	3.74
[HYP³] Met-глутататин						
feffffff 	PBRR ₁ R ₁ R ₃ RR ₂₂₂₂	-32.92	3.61	2.58	-26.73	2.02
	RBRR ₁ R ₁ R ₃ RR ₂₂₂₂	-33.14	3.94	2.99	-26.21	2.54
	PBRR ₁ R ₁ B ₃ PR ₃₂₂₂	-32.88	3.48	3.30	-26.10	2.65
	RBRR ₁ R ₁ B ₃ PR ₃₂₂₂	-33.13	3.81	3.74	-25.57	3.18

* Энергия водородных связей включена в E_{н.в.}

** Индексы 1, 2, 3, соответствуют значениям углов χ в области $0 \pm 120^\circ$, $120 \pm -120^\circ$ и $-120 \pm 0^\circ$, соответственно.

Энергия рассчитанных структур близка к сумме величин соответствующих состояний свободных фрагментов, так как они представляют собой сочетания выгодных конформационных состояний этих фрагментов. Сопоставление полученных данных свидетельствует, что решающее значение в стабилизации пространственной структуры молекул имеют дисперсионные взаимодействия, характеризующие плотность упаковки аминокислотной последовательности. Наиболее компактные структуры в меньшей мере удовлетворительны в отношении электростатических контактов, менее чувствительных к межатомным расстояниям. Стабилизирующий эффект от энергии образования водородных связей также невелик, поскольку вычислительный эксперимент был проведен применительно к водной среде, где водородные связи ослаблены. Согласно результатам расчета, полученным после минимизации энергии молекул в пространстве независимых геометрических параметров – двугранных углов ω , ϕ , ψ и χ (рис.1), наиболее предпочтительны конформации, имеющие шейпы основной цепи fefefff ([Hyp²]- и Met-глутататины) и ffffff ([Hyp³]Met-глутататин). Их преимущество перед

другими рассчитанными конформациями связано, главным образом с тем, что в них реализуются эффективные стабилизирующие взаимодействия между удаленными в последовательности остатками. Анализ вкладов межостаточных взаимодействий (табл.3) показал, что центром дисперсионной стабилизации в низкоэнергетических конформациях всех галлатостатинов может быть остаток Phe⁶.

Таблица 3.

Вклады межостаточных взаимодействий (ккал/моль) в полную энергию наиболее предпочтительных конформаций молекул Met-галлатостатинов

GLY ¹	PRO ² [HYP ²]	PRO ³ [HYP ³]	TYR ⁴	ASP ⁵	PHE ⁶	GLY ⁷	MET ⁸	
1.37	-3.17	-0.45	-0.11	-0.04	-0.01	0.00	-0.01	
1.35	-0.43	-0.50	-0.08	-0.06	-0.02	0.01	0.00	GLY ¹
1.36	-3.25	-0.29	-0.09	-0.08	0.00	0.00	0.00	
	0.76	-3.53	-2.63	-0.21	-0.04	0.00	-1.39	PRO ² [HYP ²]
	0.74	-4.48	-3.49	0.78	0.11	-0.09	-2.66	
	0.73	-0.30	-2.12	-0.43	-1.28	0.01	0.01	
	0.21	-2.43	-0.17	-0.02	0.00	0.01	0.01	PRO ³ [HYP ³]
	0.24	-2.51	-0.18	-0.02	0.00	0.01	0.01	
	0.94	-2.55	0.13	-1.75	-1.20	-0.33		
		-0.04	-1.99	-2.45	-0.25	-1.25		TYR ⁴
		0.11	-2.06	-3.08	-0.24	-0.97		
		0.04	-3.29	-1.81	-0.95	-1.71		
			-0.83	-2.57	-0.47	-1.16		ASP ⁵
			-0.82	-2.46	-0.47	-1.09		
			-0.81	-2.31	-0.88	-1.50		
				0.60	-0.33	-1.39		PHE ⁶
				0.62	-0.34	-1.51		
				0.14	-0.23	-0.83		
					1.30	-0.70		GLY ⁷
					1.29	-0.68		
					1.34	-0.55		
						0.14		MET ⁸
						0.14		
						0.23		

*Примечание. Приведены данные для глобальных конформаций Met-, [HYP²]Met-, и [HYP³]Met-галлатостатинов (1,2 и 3 строка, соответственно)

Суммарная энергия взаимодействий Phe⁶ с Tyr⁴, Asp⁵ и Met⁸ составляет -6.41, -7.05, -4.95 ккал/моль для Met, [Hyp²]- и [Hyp³]Met-галлатостатинов, соответственно. Все три молекулы характеризуются одинаковой структурой С-концевого фрагмента, представленного свернутой формой пентапептида. Поэтому существенным для проявления биологической активности молекул галлатостатинов может быть геометрия участка включающего последовательность Gly¹-Pro²-Pro³-. Замена аминокислотных остатков в природной последовательности, т.е. модификация химического строения пептидной молекулы сопровождается изменением

конформационных возможностей молекул и характера внутри- и межостаточных взаимодействий, а также устойчивости аналогов к действию пептидаз. Наличие сильных межостаточных взаимодействий между Hyp² и Pro³ (- 4.5 ккал/моль) и Pro² – Pro³ (- 3.5 ккал/моль) позволяет предположить, что [Hyp²]- и Met-галлатостатины более устойчивы к действию пептидаз, расщепляющих связь - Pro-Pro- во всех известных регуляторных пептидах [5]. Поэтому эти соединения должны обладать большим пролонгированным ингибиторным действием по сравнению с [Hyp³]Met-галлатостатином.

1. Е.М. Попов, *Структурная организация белков*, М.Наука, (1989) 35.
2. E.M.Popov, *Intern. J.Quant.Chem.*,(1979) 707.
3. H.Duve, A.H.Johnsen., A.G.Scott et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **90** (1993) 2456.
4. H.Duve., A.H.,Johnsen A.G.Scott et al. *J.Biol.Chem.* **269** (1994) 21059.
5. H.Duve., A.H.Johnsen., A.G.Scott. et al. *Regul.Pept.*, **57** (1995) 237.
6. Н.М.Годжаев, Л.И Велиева, И.Н. Алиева, *Вестник БГ*, № 1 (2000) 25.
- 7.F.A.Momany,R.F.McGuire,A.W.Burgess,H.A.Scheraga, *J.Phys.Chem.*, **179** (1975) 1371.

QALLATOSTATİNLƏR AİLƏSİNƏ DAXİL OLAN BİRLEŞMƏLƏRİN KONFOMASIYA HALLARI

L.I.VƏLİYEVA, İ.N.ƏLİYEVA, N.M.QOCAYEV, J.İ.ƏLİYEV

Atom-atom potensial funksiyalar metodu ilə qallatostatinlər ailesindən olan birləşmələrin fəza quruluşları və konformasiya imkanları öyrənilmişdir. Qalıqlararası qarşılıqlı təsir enerjisinin köməyi ilə göstərilmişdir ki, qallatostatinlərin funksional xüsusiyyətləri molekulu təşkil edən fragməntlərin konformasiya xassələri və həndəsi forması ilə əlaqədardır.

CONFORMATIONAL STATES OF COMPOUNDS OF THE GALLATOSTATIN FAMILY

L.I. VELIEVA, I.N. ALIEVA, N.M. GODJAEV, D.I. ALIEV

The spatial structure and conformational flexibility of compounds of the gallatostatin family have been studied by the method of atom-atomic potential functions. It was shown that functional peculiarities of gallatostatins were induced by the conformational properties and geometry of fragments formed of gallatostatin molecules.