

## КОНФОРМАЦИОННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ НЕЙРОКИНИНОВ А И В И ИХ АНАЛОГОВ

Г.А.АГАЕВА

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

Методом теоретического конформационного анализа были определены стабильные конформационные состояния двух нейропептидов - нейрокинина А и нейрокинина В. Определены геометрические и энергетические параметры всех оптимальных пространственных форм обоих декапептидамидов. Знание особенностей пространственного строения нейрокининов А и В позволило с помощью анализа конформационной энергии определить влияние замещения остатка Val<sup>7</sup> на Pro на трехмерную структуру этих пептидов.

### ВВЕДЕНИЕ

Нейрокинин А (NKA) и нейрокинин В (NKB) впервые были обнаружены в спинном мозге свиньи в 1983 году [1,2]. Оба нейропептида содержат по 10 аминокислотных остатков в следующей последовательности: H-His<sup>1</sup>-Lys<sup>2</sup>-Thr<sup>3</sup>-Asp<sup>4</sup>-Ser<sup>5</sup>-Phe<sup>6</sup>-Val<sup>7</sup>Gly<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Met<sup>10</sup>NH<sub>2</sub>(NKA), H-Asp<sup>1</sup>-Met<sup>2</sup>-His<sup>3</sup>-Asp<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup>-Phe<sup>6</sup>-Val<sup>7</sup>Gly<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Met<sup>10</sup>NH<sub>2</sub>(NKB).

Структурный анализ нейрокининов выявил их высокую гомологичность с нейропептидами тахикининового семейства. Однотипность выполняемых функций и сходство С-концевых последовательностей тахикининов объединяет эти пептиды в обособленный класс. Тахикининовые пептиды состоят из 10-12 аминокислотных остатков с общим С-концевым фрагментом вида -Phe-Xxx-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>.

Нейрокинины производят разнообразные физиологические воздействия и фармакологические эффекты, в том числе такие, как возбуждение спинальных мотонейронов, стимуляция слюнной и панкреатической секреции, понижение артериального давления, стимулирование сокращения гладкой мускулатуры и др. [1-3]. Как известно все биологические процессы, происходящие в живых организмах, так или иначе, связаны со структурной комплементарностью, взаимодействующими в этих процессах молекул. Поэтому, для выяснения механизма биологического эффекта, необходимо знание пространственного строения биорегулятора и его структурно-функциональных взаимосвязей. Совместный конформационный анализ природных пептидов и их биологически испытанных активных и неактивных аналогов позволяет выделить структурные критерии, необходимые для их функционирования и может способствовать созданию более эффективных аналогов.

В настоящей работе изложены основные результаты исследования пространственного строения молекул нейрокининов А и В и конформационного поведения их структурных аналогов, замещенных в положении 7 на остаток пролина (Pro), методом теоретического конформационного анализа.

### МЕТОД РАСЧЕТА

Использованная в данном исследовании классификация пептидных структур и потенциальные функции расчетной схемы полуэмпирического конформационного анализа и их параметризация описана в работах [4-6]. Невалентные взаимодействия оценивались по потенциальному Леннарда-Джонса с параметрами Скотта и Шераги. Электростатическую энергию рассчитывали в монопольном приближении по закону Кулона с использованием зарядов, предложенных Шерагой. Параметризация потенциальных функций была аппроксимирована к условиям полярной среды: величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Водородные связи, оцениваемые по потенциальному Морзе, предполагались ослабленными и максимальная энергия на равновесном расстоянии принята равной -

1,5 ккал/моль. Длины связей и валентные углы пептидной группы и боковых цепей, а также торсионные потенциалы и величины барьеров вращения соответствуют значениям, предложенным Момани и др. Поиск минимумов потенциальной энергии осуществлялся методом сопряженных градиентов. Отсчет двугранных углов вращения  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  и  $\chi^i$  проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB. Конформационное состояние каждого остатка определялось значениями двугранных углов  $\phi$ ,  $\psi$  и  $\omega$  основной цепи и  $\chi^i$  боковых цепей. Углы  $\phi$  и  $\psi$  основной цепи в конформациях находятся в низкоэнергетических областях стерической карты: R ( $\phi, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$ ), B ( $\phi = -180^\circ \div 0^\circ$ ,  $\psi = 0^\circ \div 180^\circ$ ), L ( $\phi, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$ ) и P ( $\phi = 0^\circ \div 180^\circ$ ,  $\psi = -180^\circ \div 0^\circ$ ). Введено понятие формы остатка, которое характеризует область (R, B, L или P) значений углов  $\phi$  и  $\psi$ . Все формы основной цепи дипептида разделены на два класса - свернутые и развернутые, которые называют шейпами. Символами (e) обозначаются формы с развернутой формой основной цепи (BB, BR, RL, PR, LR, PL, LB и PP), а (f) - со свернутой (RR, RB, BL, BP, PB, LL, LP и PP).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конформационное исследование нейрокинина А проводилось в три этапа, в каждом из которых использовались результаты предшествующего этапа. В свою очередь, этапы делятся на ряд последовательно решаемых структурных задач. Первый этап расчета включает рассмотрение конформационных особенностей C-концевого пентапептидного участка Phe<sup>6</sup>-Met<sup>10</sup>NH<sub>2</sub>, одинакового для нейрокининов А и В. Полученные на первом этапе исследования результаты и независимые исследования перекрывающихся тетрапептидов His<sup>1</sup>-Asp<sup>4</sup> и Asp<sup>4</sup>-Val<sup>7</sup> позволили последовательно рассмотреть конформационные возможности C-концевого гептапептида Asp<sup>4</sup>-Met<sup>10</sup>NH<sub>2</sub> и наконец, всей молекулы нейрокинина А, декапептидамида His<sup>1</sup>-Met<sup>10</sup>NH<sub>2</sub>. Выбранная в данном исследовании схема расчета молекулы нейрокинина А [7] обусловлена биологической активностью последовательно наращиваемых C-концевых фрагментов пептида.

Начальные структурные варианты для C-концевого пентапептида составлялись на основе низкоэнергетических конформационных состояний соответствующих монопептидов. В качестве начальных приближений было выбрано 428 вариантов. Расчеты конформаций C-концевого пентапептида выявили значительную дифференциацию по шейпам. Энергетически предпочтительной для пентапептида оказалась  $\alpha$ -спиральная структура (R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub>), принадлежащая ffff шейпу. Эта конформация стабилизируется двумя водородными связями между пептидными звеньями остатков i и i + 4 вдоль основной цепи. Спиральный виток способствует сближению N- и C-концевых участков фрагмента, о чем свидетельствует водородная связь: NH(Met<sup>10</sup>)...CO(Phe<sup>6</sup>). При этом бензольное кольцо боковой цепи Phe<sup>6</sup> сильно сближено с боковыми цепями остатков Leu<sup>9</sup> и Met<sup>10</sup>, что благоприятствует образованию эффективных взаимодействий между ними, энергетические вклады которых составляют -3,8 и -4,1 ккал/моль соответственно. В интервал относительной энергии 0-5 ккал/моль входят еще две конформации B<sub>2</sub>B<sub>2</sub>RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub> и B<sub>2</sub>B<sub>1</sub>BR<sub>21</sub>R<sub>22</sub>, принадлежащие шейпам eeff и eeef соответственно. Легко заметить, что чем больше развернута N-концевая часть пентапептида, тем меньше конформационная стабильность этих структур.

Для исследования конформационных возможностей двух перекрывающихся тетрапептидов His<sup>1</sup>-Asp<sup>4</sup> и Asp<sup>4</sup>-Val<sup>7</sup> нейрокинина А были составлены структурные варианты с учетом особенностей всех восьми возможных для тетрапептидов шейпов. При этом боковые цепи конечных остатков тетрапептидов были сориентированы как в сторону, так и во внутрь фрагментов. Расчет стартовых вариантов показал, что самыми низкоэнергетическими конформациями свободного тетрапептидного участка His<sup>1</sup>-Asp<sup>4</sup> оказались структуры шейпа eef ( $E_{отн.} = 0$  ккал/моль). Ненамного от них отличаются конформации очень похожего шейпа eeef. Конформации обоих этих шейпов характеризуются образованием эффективного трилептидного взаимодействия между противоположно

заряженными боковыми цепями остатков Lys<sup>2</sup> и Asp<sup>4</sup>. Эти взаимодействия вносят существенный энергетический вклад в стабильность этих конформаций. Оптимальные конформации четырёх шейпов eff, fef, eee и fff являются для данного тетрапептида почти равновероятными. Результаты расчетов конформаций N-концевого тетрапептида свидетельствуют о заметной конформационной лабильности этого свободного фрагмента. Следует отметить, что в стабильных конформациях тетрапептида Asp<sup>4</sup>-Val<sup>7</sup> самые эффективные межостаточные взаимодействия образуют остатки Phe<sup>6</sup> и Val<sup>7</sup>. Несмотря на отсутствие резкой дифференциации на этом тетрапептидном фрагменте Asp<sup>4</sup>-Val<sup>7</sup>, его конформационный анализ выявил ограниченное число низкоэнергетических конформаций по всем шейпам, определил характер стабилизирующих взаимодействий. Расчет конформаций тетрапептида Asp<sup>4</sup>-Val<sup>7</sup> в свободном состоянии показал, что этот сегмент почти одинаково может принимать  $\alpha$ -спиральную и полуизгибную структуры. Для последующего расчета C-концевого гентапептида Asp<sup>4</sup>-Met<sup>10</sup>NH<sub>2</sub> были выбраны стабильные конформации всех восьми шейпов тетрапептида.

Исследование конформационных особенностей биологически активного C-концевого гентапептида нейрокинина А проводилось на основе стабильных конформаций перекрывающихся по двум остаткам тетрапептида Asp<sup>4</sup>-Val<sup>7</sup> и C-концевого пентапептида Phe<sup>6</sup>-Met<sup>10</sup>NH<sub>2</sub> с относительной энергией до 7,5 ккал/моль. При составлении структурных вариантов гентапептида ориентации боковых цепей остатков участка Phe<sup>6</sup>-Val<sup>7</sup> брались с учетом сохранения эффективных межостаточных взаимодействий. В результате минимизации энергии составленных структурных вариантов было показано, что в интервале относительной энергии 0-10 ккал/моль входят конформации 12 структурных типов гентапептида. Энергетически предпочтительными оказались  $\alpha$ -спиральные конформации, которые отличаются, в основном, энергией дисперсионных взаимодействий, т.е. в конечном счете, плотностью упаковки. Расчет конформаций гентапептида выявил существенную дифференциацию по шейпам, поскольку из 64 рассмотренных шейпов в интервале относительной энергии 0-10 ккал/моль попадают только 12. Самой низкоэнергетической конформацией данного гентапептида является  $\alpha$ -спиральная конформация: R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub>шейпafffffff. Для конформационного исследования всей молекулы нейрокинина А были выбраны стабильные конформации тетрапептида His<sup>1</sup>-Asp<sup>4</sup> и гентапептида Asp<sup>4</sup>-Met<sup>10</sup>NH<sub>2</sub>.

Основные результаты расчета структурных вариантов нейрокинина А в условиях полярной среды представляют собой четыре семейства конформаций с величинами относительной энергии в интервале 0-10 ккал/моль. Энергетически предпочтительное и многочисленное семейство составляют структуры, содержащие  $\alpha$ -спираль на C-концевом гентапептиде. Каждое семейство конформаций декапептида формирует одну из стабильных конформаций C-концевого гентапептида. Эти семейства отличаются, главным образом, конформационным состоянием участка Asp<sup>4</sup>-Ser<sup>5</sup>-Phe<sup>6</sup>. Внутри каждого семейства конформации различаются структурным типом вариабельного N-концевого фрагмента His<sup>1</sup>-Lys<sup>2</sup>-Thr<sup>3</sup>, который должен относительно жестким участком последовательности Asp<sup>4</sup>-Met<sup>10</sup>NH<sub>2</sub>. Данный конформационно жесткий участок реализуется в четырех пространственных формах пептидной цепи. Из Таблицы 1 видно, что молекула нейрокинина А может формировать две равновероятные глобальные структуры с одинаковым значением E<sub>отн</sub>=0,0 ккал/моль: R<sub>22</sub>R<sub>33</sub>R<sub>3</sub>R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub> и B<sub>22</sub>R<sub>22</sub>R<sub>3</sub>B<sub>1</sub>B<sub>3</sub>R<sub>3</sub>R<sub>1</sub>RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub>, относящиеся к двум разным семействам. Первая из них содержит около двух витков  $\alpha$ -спирали, а другая представляет собой свернутую неупорядоченную структуру с небольшим витком спирали на C-конце. Эти структуры абсолютно изоэнергетичны, не отличаясь по значению абсолютной энергии. Первая из них формирует большой  $\alpha$ -спиральный сегмент на участке Thr<sup>3</sup>-Met<sup>10</sup>NH<sub>2</sub>. Вторая изоэнергетическая конформация формирует  $\beta$ -изгиб на участке Asp<sup>4</sup>-Ser<sup>5</sup>-Phe<sup>6</sup>-Thr<sup>7</sup> между двумя небольшими  $\alpha$ -спиралями. О наличии  $\beta$ -изгиба свидетельствует

## КОНФОРМАЦИОННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ НЕЙРОНИНИНОВ А И В И ИХ АНАЛОГОВ

расстояние между атомами  $C^\alpha$  остатков Asp<sup>4</sup> и Val<sup>7</sup>, которое меньше 7 Å, признак по которому определяют образование  $\beta$ -изгиба в пептидной цепи.

Конформационный анализ последовательно наращиваемых C-концевых фрагментов молекулы нейрокинина А выявил значительную преемственность результатов по мере увеличения длины рассматриваемой пептидной цепи. Проведенное исследование показало также степень конформационной подвижности молекулы нейрокинина А, которая предсказывается различными спектральными методами. По видимому, в зависимости от окружающей среды молекула нейрокинина А может принимать ту или иную оптимальную конформацию [7,8].

**Таблица 1**

Энергетические параметры стабильных конформаций молекулы нейрокинина А.

№	КОНФОРМАЦИЯ	Энергетические вклады (ккал/моль)			$U_{\text{отн}}$
		$U_{\text{неп}}$	$U_m$	$U_{\text{топ}}$	
1	R <sub>22</sub> R <sub>33</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-57.6	8.2	6.5	0.0
2	B <sub>12</sub> B <sub>33</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-56.0	5.5	8.3	1.8
3	R <sub>21</sub> B <sub>33</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-55.4	5.9	9.3	2.7
4	B <sub>21</sub> R <sub>22</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-56.0	9.0	8.5	4.0
5	L <sub>22</sub> B <sub>22</sub> B <sub>3</sub> R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-49.6	7.3	6.4	5.9
6	B <sub>21</sub> B <sub>22</sub> B <sub>3</sub> R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-52.4	9.9	6.1	6.5
7	R <sub>21</sub> R <sub>33</sub> B <sub>3</sub> R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-55.6	10.7	9.5	7.4
8	B <sub>22</sub> R <sub>22</sub> B <sub>2</sub> R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-49.4	9.6	5.7	8.7
9	B <sub>22</sub> R <sub>22</sub> R <sub>3</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-54.3	7.4	4.0	0.0
10	R <sub>22</sub> R <sub>33</sub> R <sub>3</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-50.3	8.4	5.0	6.0
11	R <sub>21</sub> R <sub>33</sub> B <sub>3</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-49.8	7.1	7.2	7.4
12	R <sub>32</sub> B <sub>22</sub> B <sub>3</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-45.2	7.0	4.1	8.8
13	B <sub>12</sub> B <sub>33</sub> B <sub>3</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-45.2	7.3	4.1	9.1
14	R <sub>22</sub> R <sub>33</sub> R <sub>3</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-53.9	7.4	5.4	1.8
15	R <sub>21</sub> R <sub>33</sub> B <sub>3</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-51.2	8.3	7.0	7.0
16	B <sub>12</sub> B <sub>33</sub> R <sub>3</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-46.2	6.8	4.7	8.2
17	B <sub>21</sub> B <sub>22</sub> B <sub>3</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-48.4	6.0	7.6	8.2
18	B <sub>22</sub> R <sub>22</sub> R <sub>3</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-48.2	9.9	4.2	8.8
19	R <sub>32</sub> B <sub>22</sub> B <sub>3</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-46.7	8.8	4.5	9.5
20	B <sub>22</sub> R <sub>22</sub> R <sub>3</sub> B <sub>3</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-51.0	9.4	4.2	4.9
21	R <sub>21</sub> R <sub>33</sub> B <sub>3</sub> B <sub>3</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-50.6	6.0	7.3	5.5
22	R <sub>22</sub> R <sub>22</sub> B <sub>2</sub> B <sub>3</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-50.8	10.3	4.4	6.8
23	R <sub>22</sub> R <sub>33</sub> R <sub>3</sub> B <sub>3</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-51.2	9.2	6.3	7.1
24	B <sub>21</sub> B <sub>22</sub> B <sub>3</sub> B <sub>3</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>32</sub>	-47.5	4.7	4.7	7.8

Конформационный анализ молекулы нейрокинина В был проведен по аналогичной схеме расчета что и нейрокинин А. На первом этапе конформационного анализа был проведен расчет стабильных структур C-концевого пентапептида и двух перекрывающихся тетрапептидов Asp<sup>1</sup>-Asp<sup>4</sup> и Asp<sup>4</sup>-Val<sup>7</sup>. На втором и третьем этапах исследования были последовательно определены конформационные особенности C-концевого гептапептида Asp<sup>1</sup>-Met<sup>10</sup>NH<sub>2</sub> и всей молекулы нейрокинина В [8].

Сначала были исследованы конформационные возможности двух перекрывающихся по остатку Asp<sup>4</sup> тетрапептидов Asp<sup>1</sup>-Asp<sup>4</sup> и Asp<sup>4</sup>-Val<sup>7</sup>. Расчеты показали, что для N-концевого тетрапептида Asp<sup>1</sup>-Asp<sup>4</sup> нейрокинина В характерно предпочтительное формирование конформаций  $\alpha$ -спирального типа. В интервал относительной энергии 0-2 ккал/моль попадают 8 конформаций fff шейла, а в интервал 0-3 ккал/моль конформации двух шейлов и, наконец, в интервал 0-5 ккал/моль - конформации пяти шейлов. Такое распределение конформаций тетрапептида Asp<sup>1</sup>-Asp<sup>4</sup> говорит о существенной дифференциации структур данного фрагмента. Надо отметить, что для этого тетрапептида не

наблюдается та конформационная лабильность, которая имела место на N-концевом тетрапептиде нейрокинина А.

Энергетическое распределение оптимальных конформаций тетрапептида Asp<sup>4</sup>-Val<sup>7</sup> показало, что для этого тетрапептида наиболее предпочтительными по энергии являются конформации полностью свернутого шейпа fff. Самая низкоэнергетическая конформация этого шейпа на 2 ккал/моль предпочтительнее последующей по стабильности конформации, принадлежащей шейпу eef. Энергетические параметры двух наиболее оптимальных конформаций тетрапептида Asp<sup>4</sup>-Val<sup>7</sup> R<sub>1</sub>R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>R<sub>3</sub> и R<sub>1</sub>L<sub>3</sub>R<sub>3</sub>R<sub>3</sub> различаются по энергетическому параметру дисперсионных вкладов. В целом конформации, относительные энергии которых попадают в интервал 0-3ккал/моль, практически изоэнергетичны и равновероятны. Для последующего расчёта С-концевого гептапептида нейрокинина В были составлены структурные варианты на основе оптимальных конформаций всех восьми шейпов тетрапептида Asp<sup>4</sup>- Val<sup>7</sup> и стабильных конформаций пентапептида Phe<sup>6</sup>- Met<sup>10</sup>NH<sub>2</sub>. Всего было составлено около 200 структурных вариантов. Расчет конформаций этого С-концевого гептапептида позволяет заключить, что данный фрагмент обладает некоторой конформационной ограниченностью. Самая низкоэнергетическая конформация R<sub>1</sub>R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub> шейпа ffffff на 3ккал/моль стабильнее последующей по энергетической шкале конформации B<sub>1</sub>B<sub>3</sub>R<sub>3</sub>R<sub>1</sub>RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub>, принадлежащей шейпу eeffff. Затем по шкале стабильности следует конформация B<sub>2</sub>R<sub>3</sub>B<sub>3</sub>R<sub>2</sub>RR<sub>21</sub>R<sub>32</sub> (eefeff), относительная энергия которой на 4,4ккал/моль хуже глобальной конформации. В интервал относительной энергии 0-5ккал/моль попадают конформации только трёх шейпов гептапептида.

Таблица 2

Энергетические параметры стабильных конформаций молекулы нейрокинина В.

	КОНФОРМАЦИЯ	Энергетические вклады (ккал/моль)			U <sub>отн.</sub>
		U <sub>исп.</sub>	U <sub>2д.</sub>	U <sub>торс.</sub>	
1	R <sub>1</sub> R <sub>33</sub> R <sub>32</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-58.5	5.0	6.5	0.0
2	B <sub>1</sub> B <sub>33</sub> R <sub>21</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-56.9	5.6	5.6	1.2
3	B <sub>3</sub> R <sub>22</sub> B <sub>32</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-52.6	6.6	5.8	6.8
4	B <sub>1</sub> B <sub>22</sub> B <sub>21</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-51.6	5.7	6.9	8.0
5	R <sub>1</sub> R <sub>33</sub> B <sub>32</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-51.0	5.8	6.6	8.4
6	B <sub>3</sub> R <sub>22</sub> B <sub>32</sub> B <sub>1</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-54.7	4.4	5.8	2.5
7	B <sub>1</sub> B <sub>22</sub> B <sub>21</sub> B <sub>1</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-54.2	4.0	7.4	4.2
8	R <sub>1</sub> R <sub>33</sub> B <sub>32</sub> B <sub>1</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-49.0	2.4	6.6	7.0
9	R <sub>1</sub> R <sub>33</sub> R <sub>32</sub> B <sub>1</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-51.0	3.9	7.5	8.3
10	B <sub>1</sub> B <sub>33</sub> R <sub>21</sub> B <sub>1</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-46.9	3.2	5.6	8.9
11	R <sub>1</sub> R <sub>33</sub> R <sub>32</sub> B <sub>1</sub> R <sub>3</sub> B <sub>3</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-52.8	2.8	5.7	2.7
12	B <sub>1</sub> B <sub>22</sub> B <sub>21</sub> B <sub>1</sub> R <sub>3</sub> B <sub>3</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-50.2	5.6	5.6	8.0
13	B <sub>3</sub> R <sub>22</sub> B <sub>32</sub> B <sub>1</sub> R <sub>3</sub> B <sub>3</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-49.0	6.2	5.7	9.0
14	B <sub>1</sub> B <sub>33</sub> R <sub>21</sub> B <sub>1</sub> R <sub>3</sub> B <sub>3</sub> R <sub>2</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-49.2	6.2	5.8	9.8
15	B <sub>1</sub> B <sub>22</sub> B <sub>21</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-50.2	3.7	5.7	6.2
16	R <sub>1</sub> R <sub>33</sub> R <sub>32</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-50.9	5.6	6.3	8.0
17	B <sub>3</sub> R <sub>22</sub> B <sub>32</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-48.7	6.3	4.0	8.7
18	B <sub>1</sub> B <sub>33</sub> R <sub>21</sub> B <sub>1</sub> B <sub>3</sub> R <sub>3</sub> R <sub>1</sub> RR <sub>21</sub> R <sub>3</sub>	-45.9	4.0	4.2	9.3

Для расчета стабильных конформаций всей молекулы нейрокинина В были отобраны стабильные структуры С-концевого гептапептида, относящиеся к 7 шейпам. Результаты конформационного анализа N-концевого тетрапептида Asp<sup>1</sup>-Asp<sup>4</sup> и С-концевого гептапептида Asp<sup>4</sup>-Met<sup>10</sup>NH<sub>2</sub> легли в основу расчета стабильных конформаций декапептидамида нейрокинина В.

Результаты минимизации структурных вариантов декапептидамида Asp<sup>1</sup>-Met<sup>10</sup>NH<sub>2</sub> определили оптимальные конформации декапептидамида с величинами относительной энергии в интервале 0-10 ккал/моль, которые условно образуют пять семейств конформаций. Каждое семейство низкоэнергетических конформаций объединяет общий структурный тип С-концевого гептапептида. При этом различаются конформационные состояния N-концевого трипептидного участка Asp<sup>1</sup>-Met<sup>2</sup>-His<sup>3</sup>. Отсюда можно заключить, что самые лучшие по энергии конформации декапептидамида происходят от энергетически предпочтительных конформаций С-концевого гептапептида. Например, глобальная спиральная конформация декапептидамида R<sub>1</sub>R<sub>33</sub>R<sub>32</sub>R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>R<sub>1</sub>R<sub>32</sub> происходит от глобальной  $\alpha$ -спиральной конформации С-концевого гептапептида, наращенной ещё одним витком  $\alpha$ -спирали и характеризуется образованием регулярных водородных связей. Образование сети водородных связей в низкоэнергетических конформациях молекулы нейрокинина В придает дополнительную прочность этим структурам.

Итак, теоретический конформационный анализ молекулы нейрокинина В показал, что этот пептид может быть описан набором низкоэнергетических конформаций, которые предпочтительно формируют  $\alpha$ -спираль на С-конце молекулы. Данное исследование выявило степень конформационной подвижности молекулы нейрокинина В. Сопоставление Таблиц 1 и 2 показало, что структурно гомологичные нейропептиды нейрокинин А и нейрокинин В могут формировать одинаковые по форме основной цепи пространственные структуры, различающиеся только ориентацией боковых цепей отдельных остатков. Можно заключить, что в некоторой степени структурное сходство этих двух молекул преопределяет и сходство их конформационных особенностей. Основные результаты конформационного анализа нейрокинина А и нейрокинина В показали, что эти два нейропептида в условиях полярной среды не реализуют одно единственное пространственное строение, а формируют ограниченный набор низкоэнергетических конформаций с относительно жёстким С-концевым гептапептидом и лабильным N-концевым трипептидом.

Таким образом, установленные конформационные возможности нейрокинина А и нейрокинина В указывают на их предрасположенность к взаимодействию с различными рецепторами и, вероятно, к выполнению различных функций, принимая то одну, то другую предпочтительную по энергии конформацию. Для того, чтобы однозначно соотнести набор низкоэнергетических конформаций природного пептида со спектром его известных функций, требуется привлечение синтетических аналогов, причём не любых, а обладающих вполне определёнными биологическими свойствами. Синтетические аналоги должны представлять собой такие химические модификации природной последовательности, по возможности минимальные, которые бы моделировали избирательно ту или иную конформацию исходного пептида. Тем самым, исходя из знания конформационных возможностей природного пептида и каждой его пептидной единицы (замещаемого или внедряемого аминокислотного остатка), можно целенаправленно с помощью конкретных точечных замен в последовательности молекулы воздействовать на конформационную свободу пептидной молекулы. Известно, что включение в пептидную цепь аминокислотного остатка пролина приводит к существенному ограничению конформационной подвижности предшествующего остатка, делая практически невозможным реализацию у него R-формы основной цепи. Замещения отдельных остатков в последовательности пептида на пролин значительно сокращает число его шейпов [6,9].

В этой связи, определённый научный интерес представляют исследование конформационных особенностей пролин-монозамещённых в позиции 7 аналогов нейрокинина А и нейрокинина В. Эти монозамещения производились по аналогии с работой [3], в которой было показано, что синтезированный аналог [Pro<sup>7</sup>] нейрокинина В

обладает биологической активностью природной молекулы и высокой селективностью при взаимодействии с его рецептором. В работе [3] монозамещения проводились произвольно, без знания конформационных возможностей нейрокининов. Поэтому сопоставление результатов конформационного анализа нейрокининов и их биологически активного аналога позволит определить конформационные особенности, необходимые для их функционирования. В настоящей работе, исходя из структурной гомологии исследуемых нейропептидов, было проведено также конформационное исследование монозамещенного аналога [Pro<sup>7</sup>] нейрокинина А.

Для исследования влияния остатка Pro в позиции 7 на конформационные возможности природных молекул нейрокининов А и В были выбраны четыре энергетически предпочтительные конформации из различных семейств низкоэнергетических структур этих молекул. Аналоги [Pro<sup>7</sup>] исследовались в поле четырех стабильных конформаций нейрокининов. Предполагая, что именно эти четыре структуры являются физиологически активными конформациями нейрокининов, можно определить как влияет на энергетические и геометрические характеристики этих конформаций конкретное монозамещение остатка Val<sup>7</sup> на Pro.

Таблица 3

Энергетические параметры четырех стабильных конформаций молекул нейрокининов А и В и их пролин-монозамещенных аналогов.

№	Молекула	Форма основной цепи Стабильных конформаций Нейрокининов.	Энергетические вклады (ккал/моль)			$U_{\text{общ}}$
			$U_{\text{лев}}$	$U_{\text{эн}}$	$U_{\text{топ}}$	
1.	NKA	I- R <sup>1</sup> R R R R R R R R R <sup>10</sup>	-57.6	8.2	6.5	-42.9
		II- B <sup>1</sup> R R B B R R R R R <sup>10</sup>	-54.3	7.4	4.0	-42.9
		III- B <sup>1</sup> B R R R R R R R R <sup>10</sup>	-54.9	5.5	8.3	-41.1
		IV- R <sup>1</sup> R R B R B R R R R <sup>10</sup>	-53.9	7.4	5.4	-41.1
2.	NKB	I- R <sup>1</sup> R R R R R R R R R <sup>10</sup>	-58.5	5.0	6.5	-47.0
		II- B <sup>1</sup> B R R R R R R R R <sup>10</sup>	-56.3	5.6	5.6	-45.4
		III- B <sup>1</sup> R B B R R R R R R <sup>10</sup>	-54.7	4.4	5.8	-43.5
		IV- R <sup>1</sup> R R B R B R R R R <sup>10</sup>	-52.8	2.8	5.7	-44.3
3.	[Pro <sup>7</sup> ]- NKA	I- R <sup>1</sup> R R R R R R R R R <sup>10</sup>	-36.7	5.9	7.4	-23.4
		II- B <sup>1</sup> R R B R R R R R R <sup>10</sup>	-39.1	6.3	8.3	-24.4
		III- B <sup>1</sup> B R R R R R R R R <sup>10</sup>	-34.4	2.8	10.4	-21.2
		IV- R <sup>1</sup> R R B R B R R R R <sup>10</sup>	-51.8	4.0	4.9	-42.8
4.	[Pro <sup>7</sup> ]- NKB	I- R <sup>1</sup> R R R R R R R R R <sup>10</sup>	-33.4	2.0	8.7	-22.7
		II- B <sup>1</sup> B R R R R R R R R <sup>10</sup>	-33.1	2.6	7.7	-22.7
		III- B <sup>1</sup> R B B R R R R R R <sup>10</sup>	-26.5	2.3	6.3	-17.9
		IV- R <sup>1</sup> R R B R B R R R R <sup>10</sup>	-51.8	-0.7	4.9	-47.7

Конформационное исследование аналогов [Pro<sup>7</sup>]-нейрокинина А и [Pro<sup>7</sup>]-нейрокинина В показало, что введение Pro вместо Val приводит к одинаковому существенному снижению стабильности всех исследуемых конформаций нейрокинина А, кроме конформации IV (Таблица 3.). Как показал расчет из четырех наиболее стабильных конформаций нейрокининов только конформация с формой основной цепи RRRBRBRRRR стала энергетически предпочтительной для этих аналогов [Pro<sup>7</sup>]. Это монозамещение приводит к увеличению величины конформационной энергии конформации IV и она становится того же порядка, что и глобальная  $\alpha$ -спиральная конформация природных лептидов. Тем самым можно сказать, что остаток Pro<sup>7</sup> образует достаточное количество эффективных специфических межостаточных взаимодействий в конформации IV, компенсирующих

энергетический вклад замещаемого остатка Val. Кроме того, благодаря изгибу пептидной цепи остатка Pro, образуются благоприятные электростатические и торсионные взаимодействия между окружающими пролин остатками. Эти взаимо-действия вносят дополнительный стабилизирующий эффект на данную конформацию.

Таким образом, сопоставление конформационных особенностей нейропептидов - нейрокинина А и нейрокинина В, а также их пролин-монозамещённых в позиции 7 аналогов выявило степень конформационной подвижности исследуемых пептидов и их аналогов. Проведенное исследование двух аналогов нейрокининов позволило с помощью анализа конформационной энергии оценить структурообразующую роль как замещаемого, так и вводимого остатка и определить, необходимые для связывания с рецептором структурные критерии этих пептидных биорегуляторов.

1. N.Minamino, H.Masuda, K.Kangava, H.Matsua, *Biochem. And Biophys. Commun.*, **124** (1984) 731.
2. S.Kimura , M.Okada , Y.Sugita , I.Kanazama , E.Minekata, *Proc.Japan Acad.Ser.B*, **59** (1983) 101.
3. S.Lavielle, G.Chassaing, O.Ploux, D.Loeillet, J.Besseyre, *Biochem.Pharmacol.*, **37** (1988) 41.
4. E.M.Popov, *Int.Quant.Chem.*, **16** (1979) 707.
5. Г.А.Агаева, Н.А.Ахмедов, Е.М.Попов, *Молек.биол.*, **21** (1987) 164.
6. Е.М.Попов, Г.А.Агаева, Н.А.Ахмедов, *Молек.биол.*, **21** (1987) 174.
7. N.Godjayev, G.Agayeva, N.Kerimli, S.Akyuz, *Biotecnoloji,Mikrobioloji,Molecular Bioloji, Istanbul II* (1997) 433.
8. N.Kerimli, G.Agayeva, S.Akyuz, N.Godjayev, *Biotecnoloji,Mikrobioloji,Molecular Bioloji, Istanbul II* (1997) 509.
9. P.R.Schimmel, P.Flory, *J.Mol.Biol.*, **226** (1968) 542.

**A VƏ B NEYROKİNİNLERİ VƏ ONLARIN ANALOQLARININ  
KONFORMASIYA STABİLLİY**

**G.Ə. AĞAYEVA**

Nəzəri konformasiya analizi üsulu ilə A və B neyrokinin decapeptidamidlərinin stabil konformasiya vəziyyətləri müəyyən olunmuşdur. Hər iki decapeptidamidlərin bütün optimall fəza quruluşları üçün həndesi və energetik parametrlərinin qiymətləri təyin edilmişdir. Neyrokininlərin müəyyən olunmuş konformasiya xüsusiyyətlərinin əsasında Val<sup>7</sup> qaliğının prolin ilə əvəz edilməsinin onların üçölfülü quruluşlarına təsiri konformasiya energisi analizi vasitəsi ilə öyrənilmişdir.

**CONFORMATIONAL STABILITY OF THE NEUROKININS A AND B  
AND ITS ANALOGS**

**G.Ə. AGAYEVA**

The stabil conformational states of the two decapeptideamides neurokinins A and B were determined by theoretical conformational analysis method. The geometrical and energetical parameters of the all optimal spatial structures of the both decapeptideamides were obtained. Knowledge of the conformational peculiarities of neurokinins A and B have permitted to study the influence of the substitution of Val<sup>7</sup> with Pro on the three-dimensional structure of the nature molecules by analysis of conformational energy.