

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ СТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЕКРЕТИНА,  
ГЛЮКАГОНА И ВАЗОАКТИВНОГО ИНТЕСТИНАЛЬНОГО ПЕПТИДА  
ПО ДАННЫМ КД СПЕКТРОСКОПИИ И ТЕОРЕТИЧЕСКОГО  
КОНФОРМАЦИОННОГО АНАЛИЗА**

**Г.А.АГАЕВА**

*Бакинский государственный университет,  
AZ 1148, Баку, ул.З.Халилова, 23*

Проведено сравнительное структурное исследование молекул секретина, глюкагона и вазоактивного интестинального пептида в различных растворителях (вода, липидный растворитель, додецилсульфат натрия) по данным кругового дихроизма и теоретического конформационного анализа. Полученные двумя методами результаты сопоставляются друг с другом.

**ВВЕДЕНИЕ**

На современном этапе изучения механизма действия биологически активной пептидной молекулы для подбора искусственных ингибиторов или активаторов к нему, настоятельно требуется знание его пространственной структуры. Существенные трудности использования чисто экспериментальных методов связаны, прежде всего, с большой конформационной лабильностью пептидных молекул, то есть наличием в физиологических условиях набора сравнимых по стабильности конформеров. Известно, что спектральные методы не в состоянии дать детальное описание всех стабильных конформационных состояний молекулы: величины двугранных углов, иерархию стабильности конформеров, энергетические вклады отдельных взаимодействий и т.д. Все эти проблемы разрешаются при использовании метода теоретического конформационного анализа, который позволяет определить не только набор энергетически предпочтительных конформаций сложных пептидных молекул или их фрагментов, но также может выявить структурообразующую роль каждого остатка в последовательности, оценив величину энергии всех межостаточных взаимодействий в каждой отдельной конформации [1-3]. По всей видимости, более информативным может быть комплексный подход к структурному исследованию этих пептидов, т.е. применение расчетных, полуэмпирических методов с использованием данных спектроскопических методов. Как известно с помощью спектров кругового дихроизма (КД) в интервале длин волн 200-250 нм можно определить процентное содержание для пяти структур:  $\alpha$ -спирали, антипараллельной и параллельной  $\beta$ -структур,  $\beta$ -изгибов и нерегулярных участков белка [4-8]. Детальная обработка этих спектров по методу, предложенному в [4-8], дает определенную информацию о содержании элементов вторичной структуры в пептидной молекуле и позволит провести сопоставление теоретических и экспериментальных результатов. С другой стороны, зная из результатов теоретического конформационного анализа различных фрагментов пептидной молекулы энергетические вклады отдельных взаимодействий в стабильность той или иной вторичной структуры, мы можем оценить вероятность образования и локализации конкретной вторичной структуры, предлагаемой согласно КД спектрам, в любом месте полипептидной цепи, еще не свернувшейся в трехмерную структуру.

В настоящей работе осуществлена попытка сопоставления конформационных особенностей некоторых пептидов семейства глюкагона-секретина в различных растворителях, используя данные КД и теоретического конформационного анализа. Возможности этого подхода проиллюстрированы на примере трех родственных пептидов – глюкагона, секретина и вазоактивного интестинального пептида (ВИП). Эти пептидные гормоны объединены в семействе под названием семейства глюкагона-секретина. Пептидные гормоны этого семейства функционально активны и осуществляют широкий круг физиологических воздействий как в пищеварительной, так и в центральной нервной системах [9]. Физиологические воздействия эти пептиды оказывают на плазматическую мембрану различных органов путем специфического связывания с ее рецепторным участком, активируя разнообразные процессы жизнедеятельности. Объединяет эти пептиды не только общность отдельных физиологических свойств, но, главным образом, существенная гомология их аминокислотных последовательностей. Гомология между некоторыми из них достигает до 50-60%. Ниже приведены аминокислотные последовательности молекул глюкагона, секретина и вазоактивного интестинального пептида:

#### Секретин

His<sup>1</sup>-Ser<sup>2</sup>-Asp<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>-Phe<sup>6</sup>-Thr<sup>7</sup>-Ser<sup>8</sup>-Glu<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>-Ser<sup>11</sup>-Arg<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-Arg<sup>14</sup>-Asp<sup>15</sup>-Ser<sup>16</sup>-Ala<sup>17</sup>-Arg<sup>18</sup>-Leu<sup>19</sup>-Gln<sup>20</sup>-Arg<sup>21</sup>-Leu<sup>22</sup>-Leu<sup>23</sup>-Gln<sup>24</sup>-Gly<sup>25</sup>-Leu<sup>26</sup>-Val<sup>27</sup>-NH<sub>2</sub>

#### Глюкагон

His<sup>1</sup>-Ser<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>-Phe<sup>6</sup>-Thr<sup>7</sup>-Ser<sup>8</sup>-Asp<sup>9</sup>-Tyr<sup>10</sup>-Ser<sup>11</sup>-Lys<sup>12</sup>-Tyr<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-Asp<sup>15</sup>-Ser<sup>16</sup>-Arg<sup>17</sup>-Arg<sup>18</sup>-Ala<sup>19</sup>-Gln<sup>20</sup>-Asp<sup>21</sup>-Phe<sup>22</sup>-Val<sup>23</sup>-Gln<sup>24</sup>-Trp<sup>25</sup>-Leu<sup>26</sup>-Met<sup>27</sup>-Asp<sup>28</sup>-Thr<sup>29</sup>-NH<sub>2</sub>

#### Вазоактивный интестинальный пептид

His<sup>1</sup>-Ser<sup>2</sup>-Asp<sup>3</sup>-Ala<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Phe<sup>6</sup>-Thr<sup>7</sup>-Asp<sup>8</sup>-Asn<sup>9</sup>-Tyr<sup>10</sup>-Thr<sup>11</sup>-Arg<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-Arg<sup>14</sup>-Lys<sup>15</sup>-Gln<sup>16</sup>-Met<sup>17</sup>-Ala<sup>18</sup>-Val<sup>19</sup>-Lys<sup>20</sup>-Lys<sup>21</sup>-Tyr<sup>22</sup>-Leu<sup>23</sup>-Asn<sup>24</sup>-Ser<sup>25</sup>-Ile<sup>26</sup>-Leu<sup>27</sup>-Asn<sup>28</sup>-NH<sub>2</sub>

Из сопоставления структур видно, что между последовательностями этих молекул имеется сходство как в распределении полярных, так и гидрофобных остатков. Такие пептидные последовательности носят амфипатический характер и молекулы с такими первичными структурами обычно свою физиологическую активность проявляют на границе раздела фаз мембрана-вода, причем с водой взаимодействуют гидрофильные, а с мембраной – гидрофобные остатки. Существенное структурное сходство этих пептидов предполагает и заметное конформационное сходство. Исследование конформаций некоторых из этих пептидов целым рядом физико-химических экспериментальных методов показало, что они более четко формируют вторичную структуру, нежели трехмерную. Так, например, результаты рентгеноструктурного анализа кристалла молекулы глюкагона с разрешением в 3 Å выявили структуру с достаточно большим α-спиральным участком (остатки 6-28) [10]. Спектрополярметрические исследования конформации глюкагона показали, что лишь С-концевой фрагмент глюкагона (19-29) принимает стабильную спиральную конформацию в растворах ионных и неионных детергентов [11-14]. Спектры кругового дихроизма (КД) и дисперсии оптического вращения (ДОВ) для другого пептида - секретина [15,16] также показали наличие спирального участка в структуре молекулы. В различных работах совместным использованием спектроскопии КД и ядерного магнитного резонанса были также определены вторичные структуры глюкагона [13], секретина [17] и ВИПа [18]. Данные исследования показали, что эти пептиды имеют тенденцию к образованию участка α-спиральной структуры. Кроме того, анализ

результатов конформационных исследований этих пептидов различными экспериментальными методами показывает, что пространственная структура этих молекул зависит от условий ее микроокружения. Так например, было показано, что в водном растворе доля  $\alpha$ -спиральной структуры в пептидах уменьшается. Тогда как иное окружение, особенно внутренняя неполярная область мембраны и граница мембрана-вода наоборот значительно стабилизируют  $\alpha$ -спиральную конформацию в пептидах. Поэтому становится целесообразным проведение исследования конформационной гомологии пептидов семейства глюкагона-секретина в различных растворах и конформационных перестроек при изменениях условий микроокружения.

## МЕТОДЫ РАСЧЕТА

### Теоретический конформационный анализ

Расчет стабильных структур молекулы секретина, глюкагона и вазоактивного кишечного пептида, обладающих последовательностями из 27, 29 и 28 аминокислотных остатков соответственно, был осуществлен методом теоретического конформационного анализа (ТКА) на основе поэтапного подхода [1-3]. При расчете учитывались невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионные вклады в соответствии с [1-3]. Полярность среды была учтена путем введения определенной величины диэлектрической постоянной растворителя ( $\epsilon$ ). Геометрия аминокислот и система идентификаторов конформаций были взяты из работ [1-3]. Для анализа результатов расчета использовались понятия "форма" и "шейп" пептидной цепи. Форма основной цепи молекулы определяется последовательностью форм остатков, определяемых низкоэнергетическими областями  $R(\varphi=-180^\circ-0^\circ, \psi=-180^\circ-0^\circ)$ ,  $B(\varphi=-180^\circ-0^\circ, \psi=0^\circ-180^\circ)$ ,  $L(\varphi=0^\circ-180^\circ, \psi=0^\circ-180^\circ)$  и  $P(\varphi=0^\circ-180^\circ, \psi=-180^\circ-0^\circ)$  на конформационной карте по двугранным углам основной цепи  $\varphi$ - $\psi$ . Разнообразные формы, в свою очередь, распределены по шейпам пептидного остова, определяющим направленность хода основной цепи. Во фрагменте из двух аминокислотных остатков все формы основной цепи могут быть сгруппированы в два класса – шейпы  $e$  и  $f$ . Символом  $e$  обозначаются формы с развернутой основной цепью (BB, BR, RL, PR, LR, PL, LB и PP), а  $f$  – со свернутой (RR, RB, BL, BR, PB, LL, LP и PP). В расчетах были использованы программа и техника расчета, разработанные авторами в работе [19] и примененные в работах [2,3,24-27]. Отсчет двугранных углов, проводился согласно общепринятой номенклатуре [21]. В качестве начальных приближений при расчете конформаций отдельных молекул послужили известные значения двугранных углов, соответствующих низкоэнергетическим состояниям соответствующих монопептидов.

### АНАЛИЗ СПЕКТРОВ КД

Для определения вторичной структуры секретина, глюкагона и ВИПа из их спектров КД, опубликованных в работах [17] был применен метод, изложенный в работе [4-8]. Этот метод учитывает вклад "ароматики" (ароматических и дикарбоновых аминокислотных остатков, S-S связей и т.д.) в пептидной области спектров (200-250 нм) и поэтому является более точным, чем другие существующие до настоящего времени методы. Суть метода состоит в следующем. В работе [7] было показано, что экспериментальные спектры КД белков (и олигопептидов) могут быть описаны суммой спектров из  $\alpha$ -спиралей, антипараллельной и параллельной  $\beta$ -структур,  $\beta$ -изгибов и нерегулярных участков и суммой трех эффективных логнормальных полос, которые описывают вклад

"ароматики". Решив систему нелинейных уравнений, возникающих в рамках метода наименьших квадратов, можно определить неизвестную вторичную структуру пептидной молекулы и параметры трех эффективных логнормальных полос. Систему нелинейных уравнений решали методом регуляризованных итерационных процессов Гаусса-Ньютона [22], расчеты проводились с помощью соответствующих специальных программ, реализованных на компьютере "Hewlett-Packard 9830A" и компьютере класса Pentium 3. При этом использовали значения спектров КД исследованных белков, взятые через 1нм в интервале длин волн 200÷250нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Теоретический конформационный анализ

Исследование конформационных возможностей молекул секретина, глюкагона и ВИПа, а также их отдельных фрагментов методом теоретического конформационного анализа применительно к полярной среде было проведено нами ранее [2,3,8,23-27]. Полярность среды была учтена путем введения диэлектрической проницаемости  $\epsilon=10$  [19] и ослабления энергии водородной связи (максимальная энергия при  $r_0=1,8\text{\AA}$  составляла  $-6,2\text{кДж/моль}$ ). В полярной среде заряды концевых групп и боковых цепей соотносили при рН 7. В расчетной модели N-конец пептидов был взят положительно заряженным, а C-конец заблокирован амидной группой.

### Секретин

На основе фрагментарного анализа с определенной схемой расчета нами ранее было исследовано пространственное строение молекулы секретина. [2,3,25,26]. Фрагментарный конформационный анализ молекулы позволил выявить вероятные элементы вторичной структуры в пределах молекулы пептида. Сначала были определены конформационные возможности додекапептидного фрагмента His<sup>1</sup>-Arg<sup>12</sup>, а затем последовательно были исследованы пентадекапептидный His<sup>1</sup>-Asp<sup>15</sup>, октадекапептидный His<sup>1</sup>-Arg<sup>18</sup>, докозапептидный His<sup>1</sup>-Leu<sup>22</sup> и наконец, вся молекула His<sup>1</sup>-Val<sup>27</sup>NH<sub>2</sub>. Каждый из указанных фрагментов молекулы, в свою очередь, был исследован на основе расчета составляющих их три-, тетра- и пентапептидных сегментов. В результате расчета каждого сегмента отбирались низкоэнергетические конформации каждой формы пептидной цепи, входящие в интервал относительной энергии 0÷5ккал/моль, при этом высокоэнергетические конформации данного сегмента отсеивались. Для относительно больших фрагментов интервал отбора стабильных конформаций расширялся до 10ккал/моль. Основным результатом расчета показал, что пространственное строение молекулы секретина в условиях полярной среды с  $\epsilon=10$  представляет собой два семейства конформаций, отличающихся друг от друга состоянием центрального тетрапептидного участка Arg<sup>12</sup>-Asp<sup>15</sup>. В обоих семействах конформаций имеются переменные N- и C-концевые фрагменты (V<sub>N</sub> и V<sub>C</sub>), состоящие из шести и пяти остатков соответственно. Эти фрагменты разделены конформационно жестким участком последовательности Thr<sup>7</sup>-Leu<sup>22</sup>, который может находиться в одной из двух, практически изоэнергетических, пространственных формах. Одна форма (V<sub>N</sub>-f<sub>17</sub>-V<sub>C</sub>) содержит около пяти витков  $\alpha$ -спирали и характеризуется степенью спиральности ~ 60%. Эта спиральная структура стабилизируется, благодаря образованию эффективных тетрапептидных взаимодействий между разноименно заряженными остатками, т.е. ионных пар. Вторая форма (V<sub>N</sub>-f<sub>6</sub>-efee-f<sub>6</sub>-V<sub>C</sub>) представляет собой два спиральных участка с одним – двумя витками спирали (степень ее спиральности ~40%), один из них реализуется в N-концевой (f<sub>6</sub>), а другой – в C-концевой (f<sub>6</sub>) частях молекулы. Два этих спиральных

участка соединены между собой поворотом цепи, реализующимся на фрагменте Arg<sup>12</sup>-Asp<sup>15</sup> (efee). Образование поворота цепи, на середине последовательности молекулы между двумя спиральными участками способствует сближению удаленных аминокислотных остатков и созданию двух стабильных ионных пар между разноименно заряженными остатками Glu<sup>9</sup> и Arg<sup>18</sup>, а также между Arg<sup>12</sup> и Asp<sup>15</sup>, которые реализуются образованием водородных связей. В предпочтительных конформациях обоих семейств β-изгибы реализуются и в N-концевой части молекулы, чаще всего на участке последовательности 5-8. На Рис.1 приведены стереоизображения энергетически предпочтительных конформаций из двух семейств молекулы секретина.

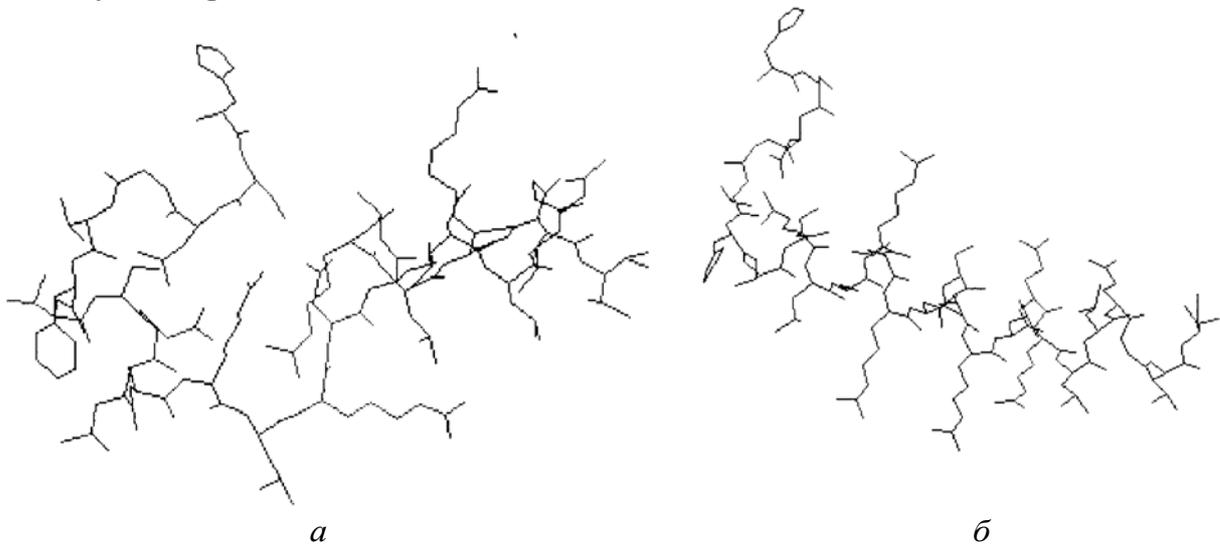


Рис.1.

Стереоизображения двух энергетически предпочтительных конформаций секретина: а) конформация первого семейства с бета-поворотом; б) альфа-спиральная конформация второго семейства.

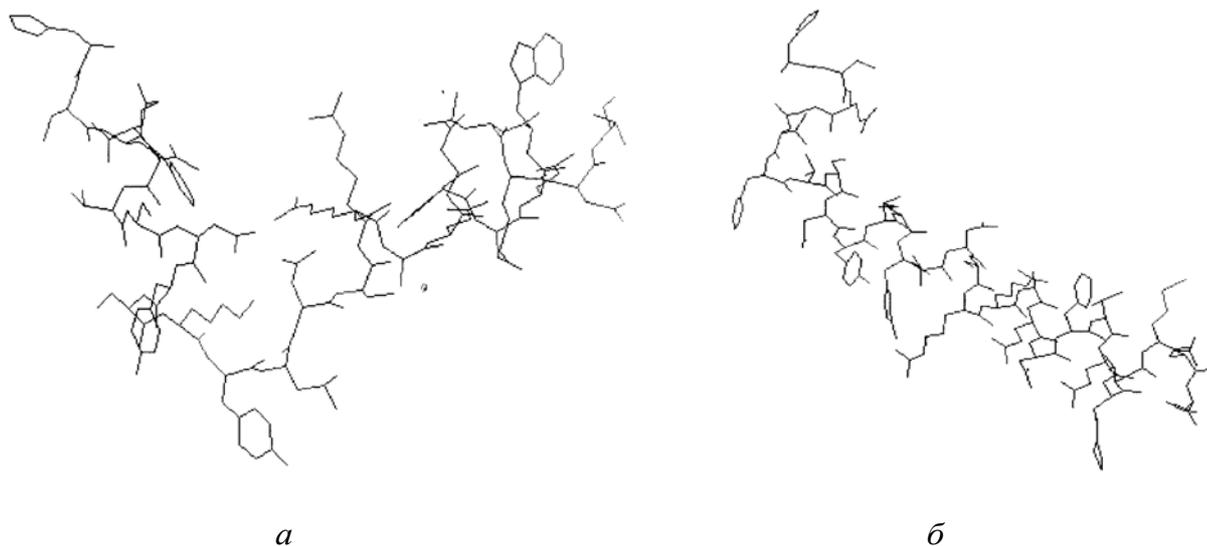
### Глюкагон

Расчет конформаций молекулы глюкагона проводился также на основе фрагментарного анализа с несколько иной схемой расчета [2,27], чем у молекулы секретина. На первом этапе исследования были определены конформационные возможности додекапептидного фрагмента His<sup>1</sup>-Lys<sup>12</sup>, на втором этапе – декапептидного Asp<sup>9</sup>-Arg<sup>18</sup> и октадекапептидного фрагмента His<sup>1</sup>-Arg<sup>18</sup> и на третьем этапе - додекапептида Arg<sup>18</sup>-Thr<sup>29</sup>NH<sub>2</sub> и наконец всей молекулы His<sup>1</sup>-Thr<sup>29</sup>NH<sub>2</sub>. Структурные варианты додекапептида His<sup>1</sup>-Lys<sup>12</sup> представляли собой различные комбинации предпочтительных конформационных состояний двух перекрывающихся фрагментов His<sup>1</sup>-Thr<sup>7</sup> и Phe<sup>6</sup>-Lys<sup>12</sup>. Расчет конформаций додекапептида определил, что первые пять остатков данного фрагмента формируют относительно лабильную структуру, тогда как остальная часть фрагмента образует более консервативную α-спиральную структуру.

На следующем этапе настоящего исследования были рассмотрены конформационные особенности декапептида Asp<sup>9</sup>-Arg<sup>18</sup>. В последовательности данного декапептида как видно из последовательности глюкагона чередуются остатки с разноименно заряженными боковыми цепями. Расчет конформаций декапептида показал, что энергетически предпочтительной для него оказалась полностью свернутая конформация, формирующая α-спираль. Эта конформация с формой основной цепи RRRRRRRRRR (f<sub>9</sub>) имеет самый большой вклад по

невалентным и электростатическим взаимодействиям. Особенно значителен вклад тетрапептидных контактов, поскольку именно эти взаимодействия осуществляют разноименно заряженные остатки, расположенные в позициях  $i$  и  $i+3$ . Лишь на 3.5 ккал/моль уступает ей по стабильности конформация с формой основной цепи RRRBRBBRRR ( $f_3$ -efee- $f_3$ ), образующей поворот цепи между двумя витками  $\alpha$ -спирали. Расстояние между атомами  $C^\alpha$  остатков Asp<sup>12</sup> и Lys<sup>15</sup> составило 6,8 Å, что свидетельствует о наличии  $\beta$ -изгиба на данном тетрапептидном участке молекулы.

Третий этап конформационного анализа глюкагона включал расчет стабильных конформаций последовательно наращиваемых его С-концевых фрагментов: гексапептида Phe<sup>22</sup>-Met<sup>27</sup>, октапептида Gln<sup>20</sup>-Met<sup>27</sup>, декапептида Arg<sup>18</sup>-Met<sup>27</sup> и, наконец, додекапептида Arg<sup>18</sup>-Thr<sup>29</sup>NH<sub>2</sub>. Конформационный анализ последовательно наращиваемых С-концевых фрагментов глюкагона показал, что начиная от гексапептида Phe<sup>22</sup>-Met<sup>27</sup> и кончая додекапептидом Arg<sup>18</sup>-Thr<sup>29</sup>NH<sub>2</sub>, т.е. от фрагмента к фрагменту энергетически предпочтительными оказывались структуры, содержащие  $\alpha$ -спиральные конформации на участке 20-26 ( $f_7$ ). Во всех случаях конформации, ведущие к дальнейшей генерации  $\alpha$ -спирали, оказались энергетически более предпочтительными, т.е. формирование нуклеации продолжилось.



**Рис.2.**

Стереобразия двух энергетически предпочтительных конформаций глюкагона: а) конформация первого семейства с бета-поворотом; б) альфа-спиральная конформация второго семейства.

На завершающей стадии исследования пространственного строения молекулы глюкагона результаты расчета показали, что в интервал относительной энергии 0-10 ккал/моль вошли два семейства конформаций, отличающихся относительно жестким участком последовательности Thr<sup>7</sup>-Leu<sup>26</sup>, который может находиться в одной из двух, почти изоэнергетических пространственных формах. Одна форма содержит пять витков  $\alpha$ -спирали ( $f_6$ ), а другая представляет собой два  $\alpha$ -спиральных сегмента, соединенных  $\beta$ -изгибом пептидной цепи ( $f_6$ -efee- $f_7$ ), который стабилизируется двумя водородными связями между ионогенными группами боковых цепей остатков Asp<sup>9</sup> и Arg<sup>18</sup>, а также Lys<sup>12</sup> и Asp<sup>15</sup>. В обоих семействах конформации характеризуются лабильными N- и С-концевыми участками ( $V_N$  и  $V_C$ ). На N-концевом участке глюкагона в некоторых низкоэнергетических конформациях также реализуются различные  $\beta$ -изгибы.

Стереоизображения энергетически предпочтительных конформаций из каждого семейства глюкагона представлены на Рис.2.

Полученные расчетные результаты были сопоставлены с кристаллографической структурой глюкагона, а также с данными спектральных методов исследования молекул семейства секретин-глюкагон в различных растворах. Проведенное сравнение показало, что расчетная конформация глюкагона с большим содержанием витков  $\alpha$ -спирали соответствует кристаллографической структуре [10], а конформация, формирующая поворот цепи на участке 12-15, соответствует структурам глюкагона, полученным методом спектрального анализа в растворах липидного состава [15]. Сопоставление полученных результатов с экспериментальными данными показало, что полуэмпирический расчет подтверждает наличие стабильной  $\alpha$ -спиральной конформации в С-концевой части молекулы глюкагона, но также предсказывает наличие такой же стабильной  $\alpha$ -спиральной структуры и в N-концевой части молекулы.

Таким образом результаты конформационного анализа двух гомологичных молекул глюкагона и секретина выявили существенное сходство их конформационного поведения. Обе молекулы в условиях полярной среды энергетически предпочтительно формируют похожие пространственные структуры с идентичными конформационными характеристиками.

#### Вазоактивный интестинальный пептид (ВИП)

Сопоставление первичных структур молекул секретина и ВИПа наряду с существенной гомологией выявило наличие существенных различий. Так например, у ВИПа в позиции 15 вместо остатка аспарагиновой кислоты (Asp) расположен основной остаток лизина (Lys) с положительно заряженной боковой цепью. Кроме того, в молекуле ВИПа в отличие от секретина в N- и С-концевых частях вместо остатков глицина в тех же позициях расположены остатки аланина и серина с более ограниченными конформационными возможностями. Конформационный анализ молекулы ВИПа проводился также на основе соответствующей схемы расчета [23,24]. Сначала были рассмотрены конформационные возможности N-концевого додекапептида His<sup>1</sup>-Arg<sup>12</sup>, затем путем наращивания последовательно были исследованы отдельные фрагменты His<sup>1</sup>-Lys<sup>15</sup>, His<sup>1</sup>-Val<sup>19</sup>, His<sup>1</sup>-Leu<sup>23</sup> и ,наконец, вся молекула His<sup>1</sup>-Asn<sup>28</sup>NH<sub>2</sub>. Фрагментарный расчет этого пептида показал, что большинство стабильных конформаций N-концевого гептапептида оказались изоэнергетичными, что говорит о конформационной индифферентности этого сегмента, несмотря на отсутствие остатка глицина, тогда как следующий по последовательности фрагмент Asp<sup>8</sup>-Arg<sup>12</sup> определенно структурно консервативен и склонен формировать  $\alpha$ -спиральную структуру. Существенную роль в стабилизации этой структуры играет пентапептидное взаимодействие между разноименно заряженными боковыми цепями остатков Asp<sup>8</sup> и Arg<sup>12</sup>. В тетрапептидном сегменте ВИПа Arg<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>- Arg<sup>14</sup>- Lys<sup>15</sup> в отличие от глюкагона и секретина сосредоточены три положительно заряженных остатка. Однако, несмотря на дестабилизирующее влияние взаимодействий одноименно заряженных остатков, этот сегмент предпочтительно формирует  $\beta$ -изгибные конформации. Напротив, формирование стабильной  $\alpha$ -спиральной структуры начинается на тетрапептидном фрагменте Gln<sup>16</sup>-Val<sup>19</sup> и продолжается на следующих фрагментах Lys<sup>20</sup>-Leu<sup>23</sup> и Leu<sup>23</sup>-Asn<sup>28</sup>. Последовательное рассмотрение конформационных возможностей фрагментов His<sup>1</sup>-Lys<sup>15</sup>, His<sup>1</sup>-Val<sup>19</sup> и His<sup>1</sup>-Leu<sup>23</sup>, а затем и всей

молекулы пептида выявило, что пространственное строение молекулы ВИПа можно также описать двумя семействами стабильных конформаций. Энергетически наиболее предпочтительным и многочисленным оказалось семейство конформаций, формирующих большой  $\alpha$ -спиральный сегмент на участке цепи Thr<sup>7</sup>-Phe<sup>27</sup> (V<sub>N</sub>-f<sub>20</sub>-V<sub>C</sub>). В конформациях второго семейства формируется стабильная  $\beta$ -изгибная структура на участке цепи Arg<sup>12</sup>-Lys<sup>15</sup> между двумя спиральными сегментами молекулы (V<sub>N</sub>-f<sub>6</sub>-efee-f<sub>10</sub>-V<sub>C</sub>). Однако наличие одноименно заряженных остатков на участке поворота цепи молекулы ВИПа препятствует формированию компактной структуры с образованием дальних взаимодействий, таких как 9-18 в секретине и глюкагоне. Поэтому в молекуле ВИПа N- и C-концевые части в результате поворота цепи на участке 12-15 сориентированы иначе, чем в двух других пептидах. При этом в обоих семействах низкоэнергетические структуры различаются конформационными состояниями гибких N-концевого гексапептидного (V<sub>N</sub>) и C-концевого дипептидного (V<sub>C</sub>) участков. В некоторых конформациях на N-концевом участке 5-8 реализуется стабильная  $\beta$ -изгибная структура. Стереорепрезентации стабильных конформаций из двух семейств молекулы ВИПа показаны на Рис.3. Наличие двух небольших  $\alpha$ -спиральных сегментов в центральной части ВИПа были выявлены также методом ЯМР в работе [18]. Отсюда можно заключить, что полученные теоретические результаты соответствуют имеющимся экспериментальным данным, позволяющим судить о конформационных особенностях ВИПа.

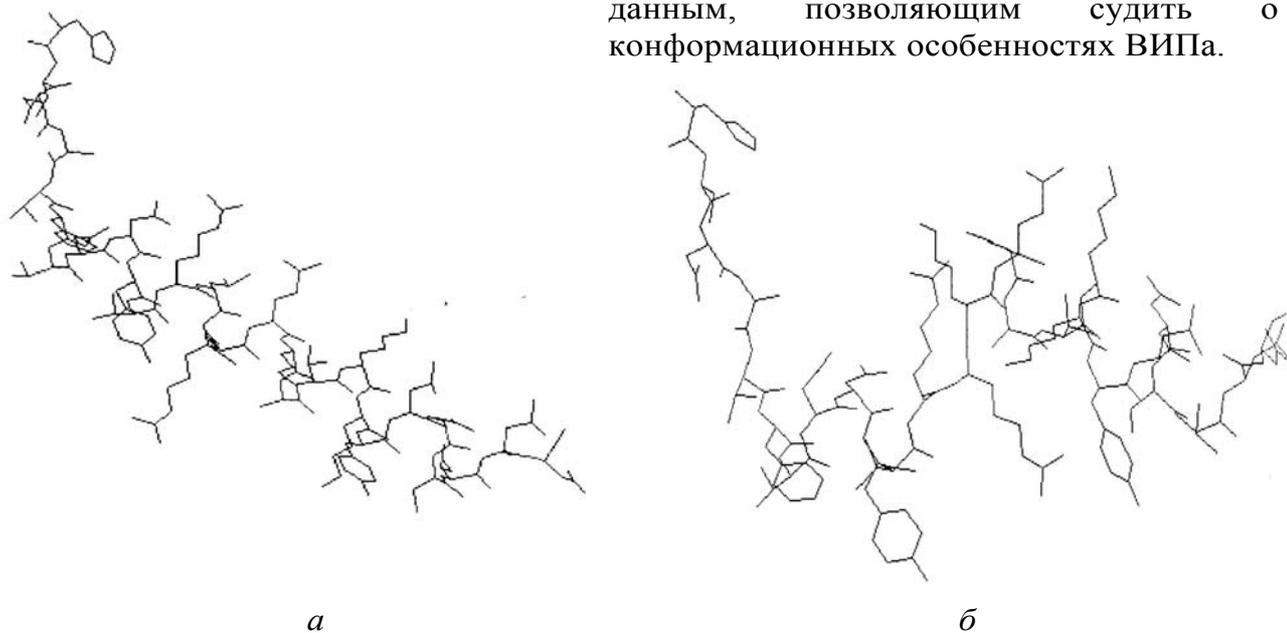


Рис.3.

Стереорепрезентации двух энергетически предпочтительных конформаций ВИПа: а) альфа-спиральная конформация первого семейства; б) конформация второго семейства с бета-изгибом цепи.

Таким образом, в результате теоретического расчета были выделены два вероятных семейства низкоэнергетических структур молекул секретина, глюкагона и ВИПа с точностью до значений отдельных углов внутреннего вращения и величин потенциальных энергий межатомного взаимодействия, соответствующих каждой структуре. Пространственное строение всех трех пептидов характеризуется наличием по меньшей мере двух  $\beta$ -изгибов, один из которых может быть локализован в N-концевой гибкой части (предположительно на участке цепи 5-8), другой в середине цепи (на участке 12-15), а также образованием двух небольших  $\alpha$ -спиральных сегментов. Как видно из расчетов для этих пептидных

молекул энергетически предпочтительными оказываются конформационные состояния, дополнительно стабилизируемые электростатическими взаимодействиями ионогенных групп молекулы. Однако в водных растворах ( $\epsilon$  воды  $\sim 81$ ) ионогенные группы молекулы пептида гидратированы и взаимодействие между ними резко ослаблено. Переход пептида из водной среды в менее полярную биофазу рецептора ( $\epsilon$  белков и пептидов  $\sim 3,5-4,0$ ) должен сопровождаться повышением эффективности взаимодействия заряженных ионогенных групп, стабилизирующего данную пространственную структуру.

**Таблица 1.**

Величины относительной энергии предпочтительных конформаций пептидов секретина, глюкагона и ВИПа в различных средах.

Молекула	Конформации из двух предпочтительных семейств пептидов	Величины относительной энергии ( $E_{отн}$ , кДж/моль) предпочтительных конформаций пептидов в различных средах ( $\epsilon$ -диэлектрическая постоянная растворителя)		
		$\epsilon = 10$	$\epsilon = 4$	$\epsilon = 81$
Секретин	1. $V_N-f_{16}-V_C$	1.0	0	2.0
	2. $V_N-f_6-efee-f_6-V_C$	0	4.4	0
Глюкагон	1. $V_N-f_{18}-V_C$	2.8	0	3.2
	2. $V_N-f_6-efee-f_7-V_C$	0	6.8	0
ВИП	1. $V_N-f_{20}-V_C$	0	0	0.8
	2. $V_N-f_6-efee-f_9-V_C$	15.2	16.8	0

Примечание:  $V_N$ - и  $V_C$ - гибкие участки N- и C-концевых частей пептидов;  $f_6$  и  $f_{10}$ - спиральные сегменты, где 6 и 10 указывают число остатков в сегменте;  $efee$ - изгибная структура.

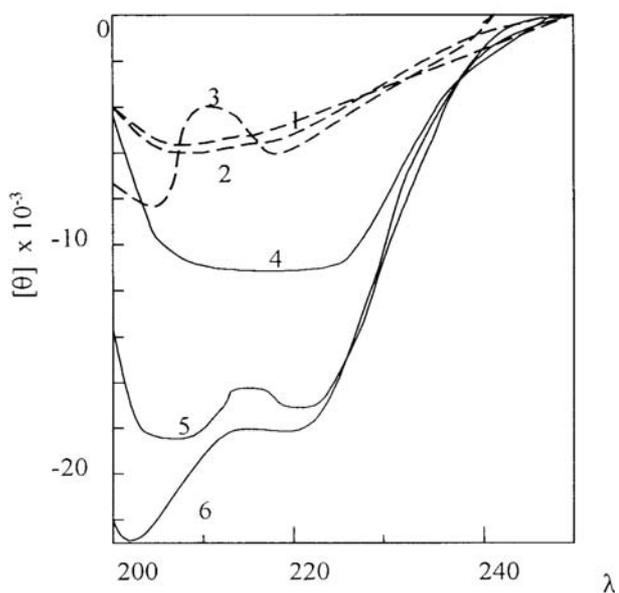
В данном исследовании поиск низкоэнергетических структур молекул проводился в двух вариантах: при  $\epsilon=4,0$  (максимальная энергия водородной связи составляет  $-20,2$ кДж/моль) и  $\epsilon=81$  (максимальная энергия при  $r_0=1,8\text{\AA}$  составляла  $-4,6$ кДж/моль), т.е. при грубом моделировании условий биофазы рецептора, либо водного окружения.

Принципиальной задачей данного исследования была также оценка наиболее низкоэнергетических конформационных состояний пептидов в средах с различной полярностью. Для конформационного анализа пептидов в различных средах были использованы низкоэнергетические конформационные состояния из двух предпочтительных семейств каждой молекулы. Полученные результаты представлены в Таблице 1. Из таблицы видно, что в слабо полярной среде ( $\epsilon=10$ ) для молекул секретина и глюкагона практически равновероятны конформации обеих семейств, а для ВИПа предпочтительны конформации с большим  $\alpha$ -спиральным участком. В среде, приближенной к условиям биофазы рецептора, все три молекулы отдают предпочтение конформациям с большим  $\alpha$ -спиральным участком. Тогда как в водном окружении ( $\epsilon=81$ ) секретин и глюкагон предпочтение отдают конформациям, формирующим  $\beta$ -изгибы на участке 12-15. Для молекулы ВИПа в водной среде обе конформации становятся равновероятными. Таким образом, было показано, что в расчетах с  $\epsilon=4,0$  более адекватно описывается ситуация, возникающая при образовании пептид-рецепторного комплекса, в составе

которого молекулы пептидов обладают природной активной конформацией, формирующей большой сегмент  $\alpha$ -спирали.

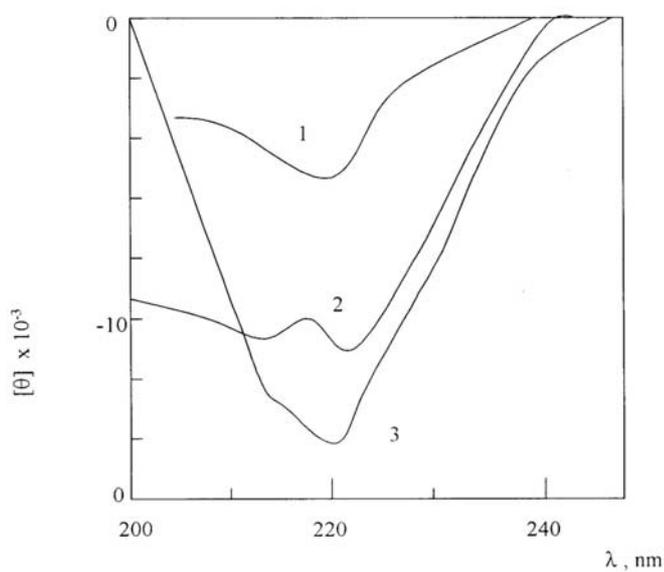
### Анализ спектров кругового дихроизма

Для экспериментальной проверки результатов теоретического конформационного анализа с помощью детально разработанной методики [5,6] были проанализированы спектры КД глюкагона, секретина и вазоактивного интестинального пептида, приведенные в работе [17]. В работе [17] были приведены спектры КД глюкагона, секретина и вазоактивного интестинального пептида в различных растворителях (вода, липидный растворитель  $4,5 \cdot 10^{-5}$ М дипальмитат L- $\alpha$ -фосфатидиловой кислоты и 0,003М додецилсульфат натрия). Остановимся поподробнее на данных, полученных из анализа спектров КД, приведенных в [17].



**Рис.4.**

Спектры КД глюкагона, секретина и вазоактивного интестинального пептида в воде (пунктирные линии 1, 2 и 3) и растворе додецилсульфата (сплошные линии 4, 5 и 6), данные [17].



**Рис.5.**

Спектры КД глюкагона, секретина и вазоактивного интестинального пептида в липидном растворителе  $4,5 \cdot 10^{-5}$ М дипальмитат L- $\alpha$ -фосфатидиловой кислоты (сплошные линии 1, 2 и 3), данные [17].

Эти данные интересны во-первых, тем, что там даны спектры КД всех трех гомологичных пептидов, что дает возможность их сопоставления и во-вторых, эти спектры получены в разных растворителях. На Рис.4 показаны спектры КД глюкагона, секретина и вазоактивного интестинального пептида в воде (пунктирные линии 1, 2 и 3) и растворе додецилсульфата (сплошные линии 4, 5 и 6), данные [17]. Как видно из Рис.4, они заметно отличаются друг от друга. Данные о вторичной структуре глюкагона, секретина и вазоактивного интестинального пептида, полученные в настоящем исследовании из анализа их спектров КД, представлены в Таблице 2. Как видно из таблицы в водном окружении все три пептида обладают небольшой степенью  $\alpha$ -спиральности, что, в принципе, согласуется с результатами, полученными другими авторами [15-18,28]. На Рис.5 показаны спектры КД для глюкагона, секретина и вазоактивного

интестинального пептида в липидном растворителе  $4,5 \cdot 10^{-5}$ М дипальмитат L-а-фосфатидиловой кислоты (сплошные линии 1, 2 и 3), данные [17]. Оказалось, что в липидном растворителе степень  $\alpha$ -спиральности во всех пептидах значительно увеличивается. В частности для глюкагона степень  $\alpha$ -спиральности в липидном растворителе увеличивается в два раза. И особенно сильное увеличение степени  $\alpha$ -спиральности для всех трех пептидов наблюдается в 0,003М растворе додецилсульфата натрия.

**Таблица 2.**

Определение вторичной структуры секретина, глюкагона и вазоактивного интестинального пептида в разных растворителях по спектрам КД из [17].

Образец	Растворитель	$f_{\alpha}$	$f_{\beta a}$	$f_{\beta n}$	$f_{\beta\text{-изг}}$	$f_n$
Секретин	Вода	0,16	0,12	0,06	0,16	0,50
	$4,5 \times 10^{-5}$ М ЛР	0,27	0,00	0,07	0,07	0,59
	0,003 М SDS	0,46	0,00	0,00	0,00	0,54
Глюкагон	Вода	0,11	0,08	0,01	0,17	0,62
	$4,5 \times 10^{-5}$ М ЛР	0,22	0,00	0,00	0,05	0,73
	0,003 М SDS	0,42	0,00	0,00	0,00	0,58
ВИП	Вода	0,24	0,11	0,01	0,14	0,50
	$4,5 \times 10^{-5}$ М ЛР	0,35	0,00	0,04	0,06	0,55
	0,003 М SDS	0,50	0,00	0,00	0,00	0,45

Примечание:  $f_{\alpha}$ ,  $f_{\beta a}$ ,  $f_{\beta n}$ ,  $f_{\beta\text{-изг}}$  и  $f_n$  – молярные доли аминокислотных остатков, находящихся в  $\alpha$ -спиралях, в антипараллельной и параллельной  $\beta$ -структуре, в  $\beta$ -изгибах и в нерегулярных участка, ЛР – липидный растворитель (дипальмитат L- $\alpha$ -фосфатидиловой кислоты, SDS – додецилсульфат натрия (расчет проводили в интервале 207÷250нм)

Из Таблицы 2 видно, что для глюкагона, секретина и вазоактивного интестинального пептида в процентном соотношении доля  $\alpha$ -спиральности в 0,003М растворе додецилсульфата натрия составляет 42%, 46% и 50%, соответственно. По данным КД, у этих пептидов доля антипараллельной и параллельной  $\beta$ -структур незначительна в воде и минимальна в двух других растворителях. Судя по процентному соотношению эти пептиды имеют по меньшей мере два  $\beta$ -изгиба, которые более вероятны в водных средах. По всей видимости эти гомологичные пептиды обладают относительно разупорядоченной структурой в водных средах, упорядочение их структур наблюдается в безводных средах, максимально моделирующих среду рецептора, находящегося на поверхности плазматической мембраны.

Конформационное пространство пептидов было исследовано методом теоретического конформационного анализа без ограничений в пространстве торсионных углов с помощью модифицированной программы и модели неявно заданного полярного (вода) и неполярного (биофаза рецептора) растворителей. Совместное использование этих параметров позволило описать более или менее количественно пространственные структуры различных конформеров, находящихся в конформационном равновесии. Оценка вторичной структуры по КД-спектрам показала в определенном процентном соотношении наличие  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -изгибов и нерегулярной структуры. Из анализа спектральных параметров расчетным методом было идентифицировано два типа участков

вторичной структуры: поворотные изгибы и  $\alpha$ -спирали. Методом теоретического конформационного анализа определили энергетически предпочтительные пространственные структуры пептидов в различных растворителях с учетом в расчетах соответствующих величин  $\epsilon$  и энергии водородной связи. По-видимому, соотношение между этими структурами зависит от природы растворителя и поэтому в расчетах необходимо привлечение дополнительных модельных представлений о взаимодействии пептидов с растворителем, а также непосредственно на поверхности рецептора. Следует отметить, что полученные результаты обсуждаются лишь с точки зрения структурной гомологии пептидов данного семейства. Показано, что все три пептида как в присутствии липидного растворителя, так и в 0,003М растворе додецилсульфата натрия находятся в конформациях с достаточно большим участком  $\alpha$ -спирали. Это согласуется с литературными данными о том, что именно  $\alpha$ -спиральная конформация обеспечивает взаимодействие между пептидами и рецепторными белками. Сопоставление результатов расчетов вторичной структуры по КД-спектрам и теоретического конформационного анализа пептидов семейства глюкоагон-секретина подтверждает их принадлежность к молекулам с высоким содержанием  $\alpha$ -спиральной конформации. Такое сопоставление результатов эксперимента и теории может служить до некоторой степени критерием правильности проведения теоретических конформационных расчетов на основе фрагментарного анализа.

1. Е.М.Попов, *Молек. Биол.*, **19**, (1985),1107.
2. Г.А. Агаева, Н.А.Ахмедов, Е.М.Попов, *Молек. Биол.*, **19** (1987) 164.
3. Н.А.Ахмедов, Г.А.Агаева, Е.М.Попов, *Молек. Биол.*, **19** (1987) 174.
4. I.A.Bolotina, V.O.Chekhov, V.J.Lugauskas, *Int.J.Quant.Chem.*, **16** (1979) 819.
5. И.А.Болотина, В.О.Чехов, В.Ю.Лугаускас, О.Б.Птицын, *Молек. Биол.*, **19** (1980) 902.
6. И.А.Болотина, В.О.Чехов, В.Ю.Лугаускас, О.Б.Птицын, *Молек.биол.*, **15** (1981) 167.
7. И.А.Болотина, В.Ю.Лугаускас, *Молек. Биол.*, **19** (1985) 1409.
8. Г.А.Агаева, И.А.Болотина, В.О.Чехов, *Биофизика*, **XXXIV** (1989) 14.
9. П.К.Климов, *В кн.: Пептиды и пищеварительная система. Л.:Наука*, (1983) 272.
10. K.Sasaki, S.Dockerrill, D.A.Adamiak, I.J.Tickle, T.L.Blundell, *Nature*, **57** (1975) 751.
11. C.Boesch, L.R.Brown, K.Wuthrich, *Biochimica et Biophysica Acta*, **603** (1980) 298.
12. C.S.C.Wu, J.T.Yang, *Biochemistry*, **19** (1980) 2117.
13. P.Y.Chou, G.D.Fasman, *Biochemistry*, **14** (1975) 2536.
14. W. Braun, G. Wider, K.H.Lee, K.Wuthrich, *J.Mol.Biol.*, **169** (1983) 921.
15. M.Clore, S.R.Martin, A.M.Gronenborn, *J.Mol.Biol.*, **191** (1986) 553.
16. G.M.Clore, M.Nilges, A.Brunger, A.M.Gronenborn, *Eur.J.Biochem.*, **171** (1988) 479.
17. R.M.Robinson, E.W.J.Blakeney, W.Mattice, *Biopolimers*, **21** (1982) 1217.
18. Y.Theriault, Y.Boulanger, S. St.Pierre, *Biopolimers*, **31** (1991) 459.
19. Е.М.Попов, *Int. J.Quant. Chem.*, **16** (1979) 707.
20. Н.М. Годжаев, И.С. Максумов, Л.И. Исмаилова, *Ж. Структ. Хим.*, **24** (1983) 147.
21. IUPAC-IUB, *Biochem.J.*, **121** (1971) 577.

22. R.Fletcher, J.Reeves, *Computer J.*, **7** (1964) 149.
23. Г.А.Агаева, *Вестник БГУ, серия физ. Мат. Наук*, №2 (1998) 26.
24. G.A.Agaeva, *The Journal of Astronomy and Physics, Istanbul University*, **62**(2000) 45.
25. Г.А.Агаева, *Ж. Физика НАН Азербайджана*, **6** № 2 (2000) 5.
26. G.A.Agaeva, *The Journal of Astronomy and Physics, Istanbul University*, **62** (2000) 59.
27. Г.А.Агаева, *Ж. Физика НАН Азербайджана*, **6** № 3 (2000) 27.
28. S.Gandhi, I.Rubinstein, T.Tsueshita, H.Onyuksel, *Peptides*, **23** N1 (2002) 201.

**SEKRETİN, QLYUKAQON VƏ VAZOAKTİV İNTESTİNAL PEPTİDİN DD-  
SPEKTROSKOPIYA VƏ NƏZƏRİ KONFORMASIYA ANALİZİ ÜSULLARIN NƏTİCƏLƏRİ  
ƏSASINDA MÜQAYİSƏLİ QURULUŞ TƏDQIQATI**

**G.Ə.AĞAYEVA**

Sekretin, qlyuqaqon və vazoaaktiv intestinal peptid molekulların müxtəlif məhlullarda (su, lipid və natriumun dodesilsulfatı məhlulları) dairəvi dixroizm spektroskopiyaya və nəzəri konformasiya analizi üsulları vasitəsi ilə müqayisəli quruluş tədqiqatı aparılmışdır. Hər iki üsuldən alınan nəticələr müqayisə olunmuşdur.

**COMPARATIVE STRUCTURAL STUDY OF THE SECRETIN, GLUCAGON AND  
VASOACTIVE INTESTINAL PEPTIDE FROM CD SPECTROSCOPY AND THEORETICAL  
CONFORMATIONAL ANALYSIS**

**G.A.AGAEVA**

The comparative structural study of the secretin, glucagons and vasoactive intestinal peptide in the different solvents (water, aqueous solutions of lipids and sodium dodecyl sulfate) have been carried out from circular dichroism spectroscopy and theoretical conformational analysis. The results obtained by the two methods are compared.

Редактор: А.Гарибов