

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА НЕЙРОПЕПТИДОВ СЕМЕЙСТВА
АЛЛАТОСТАТИНОВЛ.И.ВЕЛИЕВА, М.А.МУСАЕВ, И.Н.АЛИЕВА, Н.М.ГОДЖАЕВ
Бакинский Государственный Университет

Методом молекулярной динамики изучена конформационная подвижность нейропептидов, принадлежащих семейству аллатостатинов. Расчет молекулярной динамики нейропептидов проводился в вакууме и в условиях явно заданных молекул воды. В последнем случае пептид помещали в прямоугольный ящик с 190 молекулами воды с наложенными периодическими граничными условиями. Проведена количественная оценка пределов изменения двугранных углов основной цепи нейропептидов в процессе молекулярной динамики.

ВВЕДЕНИЕ

Аллатостатины - биологически активные нейропептиды, которые играют ключевую роль в регуляции процессов синтеза и выделения ювенильных гормонов у различных видов насекомых [1-4]. Важную роль в реализации функций аллатостатинов играют их конформационные свойства и трехмерная пространственная организация, изучение которых необходимо для понимания механизмов функционирования нейропептидов на молекулярном уровне. В данной работе методом молекулярной динамики проведено исследование конформационной подвижности нейропептидов-аллатостатина IV и шистостатина V, различающихся аминокислотными остатками в первом положении пептидной цепи. Первичная структура нейропептидов является линейной последовательностью восьми аминокислотных остатков Хаа-Arg2-Leu3-Tyr4-Ser5-Phe6-Gly7-Leu8-NH₂, где Хаа - остаток аспарагиновой кислоты в аллатостатине IV или глицин в шистостатине V. В химической структуре нейропептидов содержатся также остатки с ароматическими кольцами в положениях 4 и 6 пептидной цепи и два аминокислотных остатка с заряженными функциональными группами на концах своих боковых цепей. Это отрицательно заряженная карбоксильная группа у остатка аспарагиновой кислоты (Asp1) и положительно заряженная гуанидиновая группа у аргинина (Arg2). Наличие объемной боковой цепи с разветвлением при C^γ-атоме в остатках лейцина (Leu3, Leu8) может оказать существенное влияние на конформационные свойства исследуемых соединений. Исследования проводились методом

молекулярной динамики [5-8] с помощью пакета прикладных компьютерных программ "HYPERCHEM" - универсальной вычислительной программы, позволяющей проводить расчеты методами молекулярной динамики, квантовой химии и молекулярной механики [9].

МЕТОД РАСЧЕТА

В методе молекулярной динамики рассчитываются классические траектории движения атомов макромолекулы в силовом поле атом-атомного потенциала, т.е. моделируется детальная микроскопическая картина внутренней тепловой подвижности макромолекулы в субнаносекундных интервалах времени. Основу метода составляет численное решение классических уравнений Ньютона для системы взаимодействующих частиц:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = \vec{F}_i(\vec{r}), \text{ где } i=1,2,\dots,n, \vec{r}_i - \text{ радиус вектор } i\text{-го атома, } m_i - \text{ его}$$

масса, \vec{F}_i суммарная сила, $\vec{F}_i(\vec{r}) = -\frac{\partial U(\vec{r})}{\partial \vec{r}_i}$, действующая на i -ый атом

со стороны остальных частиц, $\vec{r} = \{ \vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n \}$, $U(\vec{r})$ - потенциальная энергия, зависящая от взаимного расположения всех атомов, n - число атомов. Задав координаты и скорости всех частиц в начальный момент времени, численно решают уравнения движения, вычисляя на каждом шаге все силы и новые координаты и скорости частиц. Температура определяется как средняя кинетическая энергия, приходящаяся на одну степень

свободы системы: $T(t) = \frac{1}{3Nk_b} \sum_{i=1}^n m_i \vec{v}_i^2$, $\vec{v}_i = \frac{d\vec{r}_i}{dt}$. Здесь N -полное чис-

ло степеней свободы молекулы, k_b - постоянная Больцмана. В случае изолированной системы $N=3n-6$, поскольку сохраняется ее полный импульс и момент импульса. Кроме того, в этом случае сохраняется полная энергия системы, а температура получается усреднением ее мгновенных значений $T(t)$ по некоторому интервалу времени.

Для учета эффектов энергообмена с внешней средой и поддержания температуры системы используется специальный алгоритм-термостат Берендсена. Отклонения температуры (T) от ее равновесного значения (T_0)

корректируются согласно уравнению Ландау-Теллера: $\frac{dT(t)}{dt} = \frac{T_0 - T(t)}{\tau}$,

где $T(t)$ -текущее значение температуры. Отклонения в значении температуры экспоненциально убывают с характерным временем τ . Изменение кинетической энергии моделируется путем перемасштабирования скоростей атомов молекулярной системы на каждом шаге:

$$\lambda = \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau_1} \left(\frac{T_0}{T(t - \frac{\Delta t}{2})} - 1 \right)}, \text{ где } \lambda\text{-коэффициент пересчета скоростей, } \tau_1 -$$

постоянная времени порядка 1 пс. Начальные скорости атомов выбираются с помощью генератора случайных чисел в соответствии с распределением Максвелла при заданной температуре.

Потенциальная энергия молекулы задается в виде: $E_{\text{конф}} = E_{\text{нев}} + E_{\text{эл}} + E_{\text{тор}} + E_{\text{вод.св.}} + E_{\text{вал}} + E_{\text{хим}}$, где слагаемые отвечают следующим типам взаимодействий: $E_{\text{нев}}$ - невалентным, или ван-дер-ваальсовым контактам; $E_{\text{эл}}$ - электростатическим взаимодействиям; $E_{\text{тор}}$ - торсионным углам; $E_{\text{вод.св.}}$ - водородным связям; $E_{\text{хим}}$ - химическим связям; $E_{\text{вал}}$ - валентным углам. Для ускорения расчетов ван-дер-ваальсовых, водородных и электростатических взаимодействий используется радиус обрезания 12 Å. Потенциальные функции, описывающие различные типы межатомных взаимодействий и их параметризация соответствуют данным работ [7,8]. Для избежания нежелательных краевых эффектов октапептидные цепи были дополнены остатками ацетила в начале и N-метиламином в конце цепи.

Учет влияния окружающей среды на конформационную подвижность изучаемых молекул в рамках метода молекулярной динамики проводился путем введения в систему молекул окружающей водной среды и наложением периодических граничных условий [6]. Молекулы помещались в гипотетический ящик с размерами 20Åx20Åx20Å; общее число молекул воды в таком ящике составило 190. Поиск низкоэнергетических конформаций молекулярной системы проводился с помощью численных методов поиска экстремумов функций многих переменных. При этом предполагается, что нативная конформация находится в области глобального минимума потенциальной энергии.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственная структура молекулы аплатостатина IV и молекулы пшистостатина V была изучена на основе стабильных конформаций метиламидов N-ацетил-α-аминокислот с учетом различных ориентаций их боковых цепей методом молекулярной механики в работе [10]. В таблицах 1 и 2 приведены значения двугранных углов и система водородных связей в низкоэнергетических конформациях исследуемых молекул, рассчитанных методом теоретического конформационного анализа. Отсчет двугранных углов вращения проводился согласно стандартной номенклатуре [11].

Таблица 1
 Двугранные углы (град) основной и боковых цепей аминокислотных
 остатков в низкоэнергетических конформациях аллатостатина
 IV и шистостатина V

Амино-кислотный остаток	Аллатостатин IV (конформация с $E_{\text{конф}} = -154,4$ кДж/моль)	Аллатостатин IV (конформация с $E_{\text{конф}} = -148,1$ кДж/моль)	Шистостатин V (конформация с $E_{\text{конф}} = -135,9$ кДж/моль)	Шистостатин V (конформация с $E_{\text{конф}} = -135,1$ кДж/моль)
Asp1/Gly1	$\varphi = -89, \psi = -44, \omega = 178, \chi_1 = 54, \chi_2 = 105$	$\varphi = -73, \psi = -43, \omega = 178, \chi_1 = 61, \chi_2 = 112$	$\varphi = 66, \psi = 57, \omega = 180$	$\varphi = 79, \psi = 85, \omega = 189$
Arg2	$\varphi = -134, \psi = 97, \omega = 179, \chi_1 = -67, \chi_2 = 174, \chi_3 = 161$	$\varphi = 53, \psi = 57, \omega = 175, \chi_1 = 57, \chi_2 = 179, \chi_3 = 181$	$\varphi = -129, \psi = -66, \omega = 183, \chi_1 = -62, \chi_2 = 180, \chi_3 = 180$	$\varphi = -104, \psi = -66, \omega = 183, \chi_1 = 182, \chi_2 = 183, \chi_3 = 178$
Leu3	$\varphi = -99, \psi = 94, \omega = 183, \chi_1 = 54, \chi_2 = 177, \chi_3 = 182$	$\varphi = -100, \psi = 94, \omega = 183, \chi_1 = -56, \chi_2 = 174, \chi_3 = 187$	$\varphi = -99, \psi = 86, \omega = 183, \chi_1 = -52, \chi_2 = 177, \chi_3 = 186$	$\varphi = -109, \psi = 131, \omega = 177, \chi_1 = -54, \chi_2 = 174, \chi_3 = 185$
Tyr4	$\varphi = -150, \psi = 165, \omega = 177, \chi_1 = -67, \chi_2 = 95, \chi_3 = 180$	$\varphi = -148, \psi = 165, \omega = 178, \chi_1 = -65, \chi_2 = 96, \chi_3 = 179$	$\varphi = -151, \psi = 169, \omega = 176, \chi_1 = -67, \chi_2 = 93, \chi_3 = 180$	$\varphi = -121, \psi = -56, \omega = 176, \chi_1 = -62, \chi_2 = 102, \chi_3 = 179$
Ser5	$\varphi = -71, \psi = -52, \omega = 171, \chi_1 = 56, \chi_2 = 177$	$\varphi = -69, \psi = -52, \omega = 171, \chi_1 = 57, \chi_2 = 179$	$\varphi = -66, \psi = -52, \omega = 171, \chi_1 = 56, \chi_2 = 179$	$\varphi = -96, \psi = -63, \omega = 181, \chi_1 = 58, \chi_2 = 178$
Phe6	$\varphi = -60, \psi = -29, \omega = 178, \chi_1 = 62, \chi_2 = 81$	$\varphi = -60, \psi = -29, \omega = 178, \chi_1 = 62, \chi_2 = 81$	$\varphi = -61, \psi = -29, \omega = 176, \chi_1 = 62, \chi_2 = 79$	$\varphi = -108, \psi = 155, \omega = 180, \chi_1 = -46, \chi_2 = 141$
Gly7	$\varphi = 80, \psi = -77, \omega = 182$	$\varphi = 80, \psi = -77, \omega = 182$	$\varphi = 80, \psi = -77, \omega = 183$	$\varphi = 77, \psi = -68, \omega = 178$
Leu8	$\varphi = -104, \psi = -60, \omega = 179, \chi_1 = 53, \chi_2 = 176, \chi_3 = 186$	$\varphi = -104, \psi = -60, \omega = 179, \chi_1 = -53, \chi_2 = 176, \chi_3 = 186$	$\varphi = -104, \psi = -60, \omega = 179, \chi_1 = -52, \chi_2 = 177, \chi_3 = 186$	$\varphi = -100, \psi = -57, \omega = 181, \chi_1 = -53, \chi_2 = 175, \chi_3 = 186$

Молекулярная динамика нейропептидов проводилась в следующей последовательности. Вначале расчета проводилась релаксация молекул нейропептидов с использованием силового поля AMBER в течение 30 пс. Найденный энергетический минимум (рис.1,а-г) позволяет поместить молекулу в объем, содержащий 190 молекул воды. Далее проводится релаксация молекул с учетом реального водного окружения молекул (рис.2, а-г). Для имитации водного окружения частота столкновений атомов с молекулами воды задана равной 50 пс^{-1} .

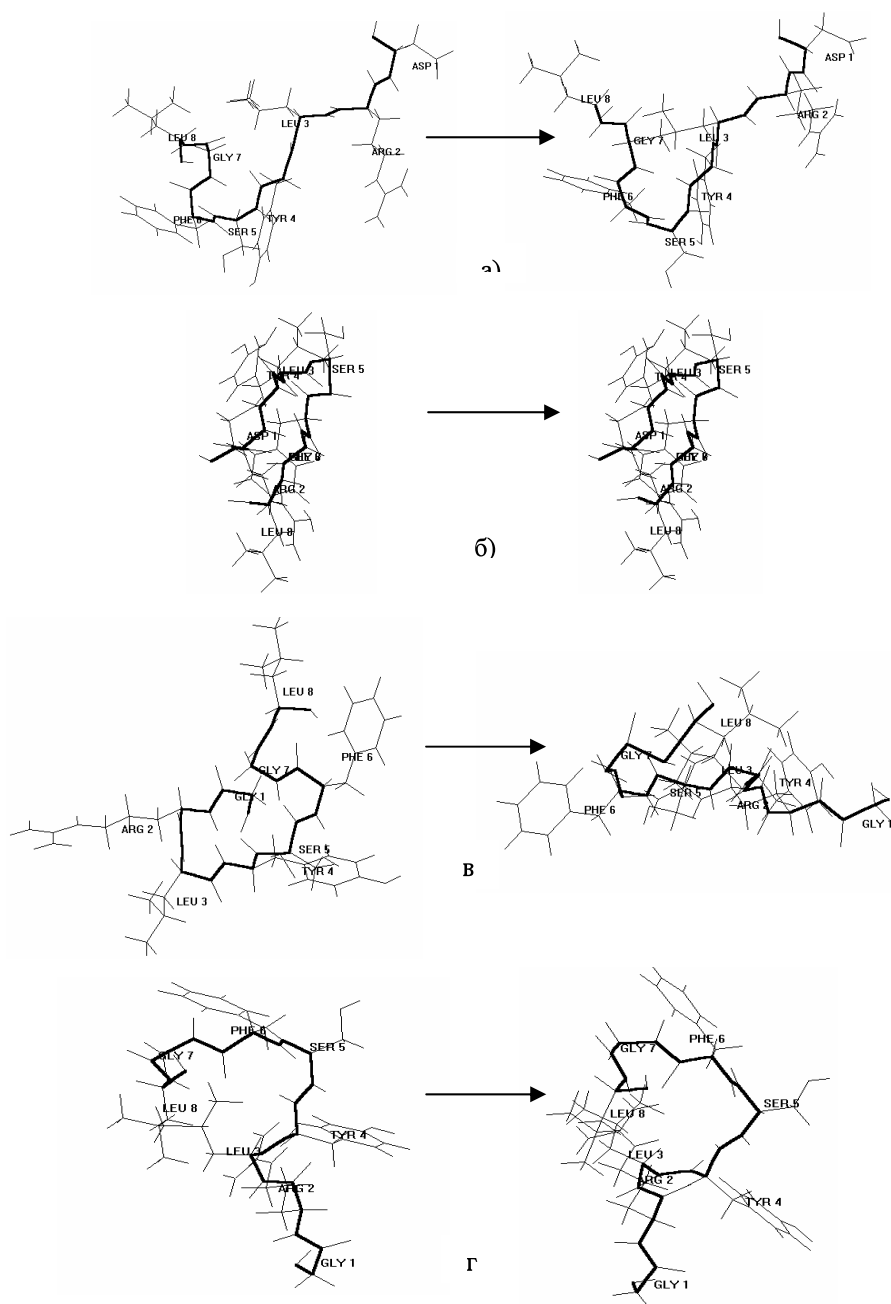


Рис.1 Релаксация молекул нейропептидов в вакууме
 (а, б- конформации аллатостатина IV с $E_{\text{конф}} = -154,9$ кДж/моль и $-148,1$ кДж/моль,
 соответственно; в,г-конформации шистостатина
 V с $E_{\text{конф}} = -135,9$ кДж/моль и $-135,1$ кДж/моль, соответственно)

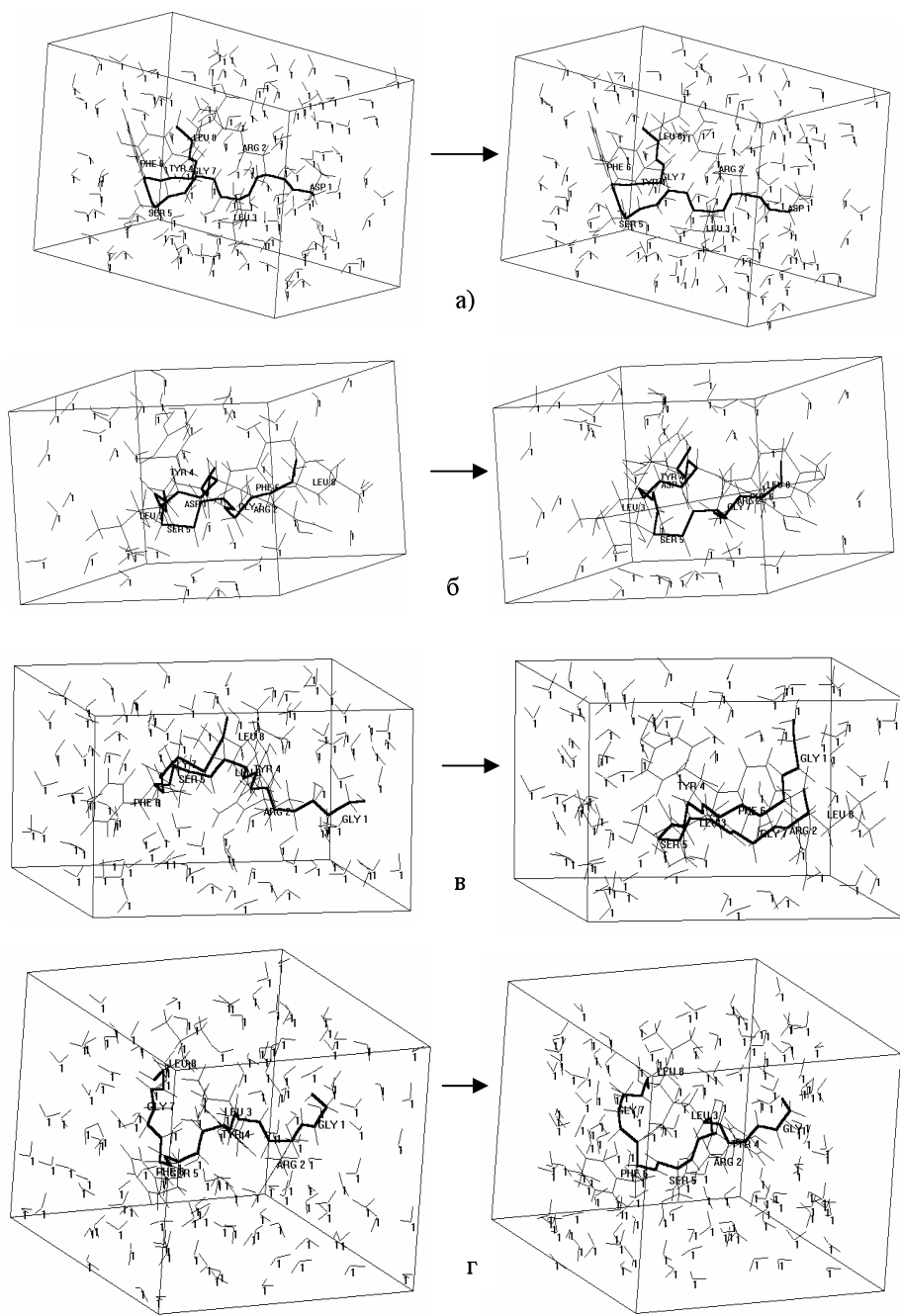


Рис.2 Молекулярная динамика нейропептидов в водной среде
 (а,б-конформации аллатостатина IV с $E_{\text{конф}}=-154,9$ кДж/моль и $-148,1$ кДж/моль,
 соответственно; в,г-конформации шистостатина
 V с $E_{\text{конф}}=-135,9$ кДж/моль и $-135,1$ кДж/моль, соответственно)

Таблица 2

Водородные связи в глобальных конформациях аллатостатина IV и шистостатина V

Молекула	Водородная связь	Расстояние между атомами (в Å)
Аллатостатин IV	(Asp1)C' O... HN(Arg2)	2,8
	(Tyr4)C' O ... HN(Gly7)	2,0
	(Ser5)NH ... OH (Ser5)	2,5
	(Phe6)C' O... HN(Leu8)	2,1
Шистостатин V	(Gly1)NH... OC' (Tyr4)	1,9
	(Ser5) C' O... HN(Phe6)	2,4
	(Ser5)NH ... OH (Ser5)	2,5
	(Phe6)C' O... HN(Leu8)	1,9

Согласно результатам расчета основная цепь нейропептидов может принимать ограниченное число низкоэнергетических конформационных состояний. Установлена значительная конформационная подвижность N-концевой последовательности, включающей остатки 1-4 как вакууме, так и в водной среде по сравнению с C-концевым тетрапептидным фрагментом Tyr4-Leu8. Последний обладает жесткой структурой пептидного остова, о чем свидетельствует наличие β -поворота во всех рассчитанных структурах до и после оптимизации. Расстояние между C ^{α} -атомами остатков Tyr4 и Gly7 варьирует в пределах 4,3- 6,2 Å, а водородная связь между CO и NH-группами пептидной цепи не разрушается в процессе молекулярной динамики, несмотря на изменения во внутримолекулярной энергии нейропептидов на 40-60 кДж/моль.

Рассмотрим более подробно конформационные свойства отдельных аминокислотных остатков. В процессе молекулярной динамики нейропептидов отклонения угла ϕ (торсионный угол вращения вокруг связи N-C ^{α}) от своего оптимального значения для Asp1(или Gly1) варьируют в пределах $\pm 40^\circ$ (таблица 3). Максимальные отклонения для угла ψ -торсионного угла вращения вокруг связи C ^{α} -C' достигают значений $\pm 17^\circ$.

Таблица 3

Пределы изменения углов (град) основной цепи
аллатостатина IV и шистостатина V в процессе молекулярной динамики

А/к остаток	А л л а т о с т а т и н IV								Ш и с т о с т а т и н V							
	Углы до (а) и после (б) оптимизации								Углы до (а) и после (б) оптимизации							
	$E_{\text{отн.}} = -154,9$ кДж/моль				$E_{\text{отн.}} = -148,1$ кДж/моль				$E_{\text{отн.}} = -135,9$ кДж/моль				$E_{\text{отн.}} = -135,1$ кДж/моль			
	φ		ψ		φ		ψ		φ		ψ		φ		ψ	
	а	б	а	б	а	б	а	б	а	б	а	б	а	б	а	б
Asp1(Gly1)	-89	-141	-44	-38	-73	-105	-43	-60	66	26	57	41	76	103	-71	-74
Arg2	-133	-123	97	104	54	38	57	72	-129	-109	-66	-72	-105	-98	-51	-68
Leu3	-99	-131	94	100	-100	-143	94	88	-99	-67	87	84	-89	-67	102	98
Tyr4	-149	-146	165	156	-148	-142	165	157	-151	-143	169	160	-121	-123	-56	-59
Ser5	-71	-74	-52	-51	-69	-73	-52	-58	-67	-71	-53	-56	-86	-96	-53	-57
Phe6	-60	-64	-29	-33	-60	-69	-29	-35	-61	-63	-30	34	-89	-86	155	147
Gly7	80	122	-77	-95	80	135	-77	-59	81	108	-77	-87	78	29	-69	-112
Leu8	-104	-88	-60	-48	-104	-96	-61	-49	-104	-82	-61	-75	-101	-88	-58	-79

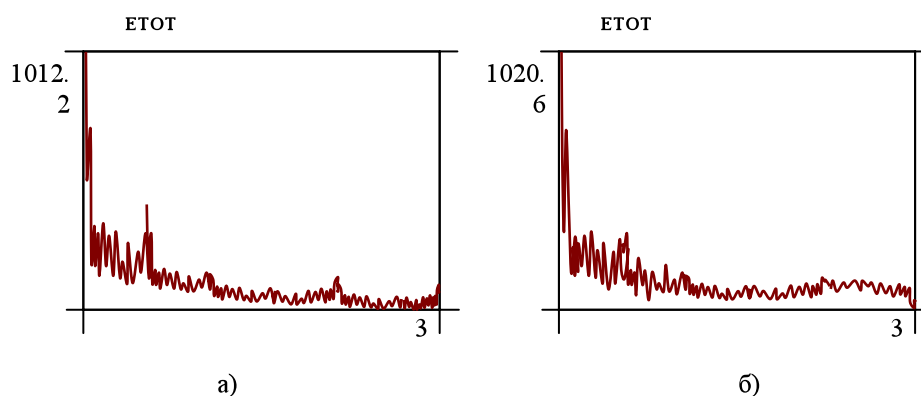
Как видно из таблицы 3 вращения по углам ϕ и ψ ограничены для остатка аргинина; максимальное отклонение от их низкоэнергетических значений равно 20° . Двугранные углы в боковой цепи остатка аргинина принимают значения, близкие к минимумам их торсионных потенциалов, т.е. $\chi_{1,2,3} = \pm 60$ и 180° . Отклонения $\pm 5^\circ$ от минимального значения выявлены лишь для угла χ_3 . Вращение по углу χ_1 существенно ограничено из-за эффективных электростатических взаимодействий гуанидиновой группы аргинина. Конформационная подвижность основной и боковой цепи остатка Leu3 в вакууме и водной среде отличается от конформационных свойств предшествующих остатков пептидной цепи. В процессе оптимизации в водной среде угол ϕ может изменяться в пределах $\pm 35^\circ$ от своего оптимального положения, в то время как вращение по углу ψ ограничено и составляют $\pm 6^\circ$. Согласно результатам проведенных исследований углы χ_1 - χ_3 в Leu3 мало подвижны и принимают значения, близкие к минимумам их торсионных потенциалов (± 60 и 180°).

Как видно из табл.3 конформационная подвижность участка Tug4-Phe6 существенно ограничена. Так например, углы ϕ и ψ основной цепи остатков в 5-м и 6-м положениях цепи могут отклоняться от своих оптимальных значений на 10° по сравнению с предшествующим участком цепи. Этот факт объясняется участием этих остатков в формировании β -поворота на данном фрагменте пептидной цепи. Значения угла ϕ в Tug4 соответствуют одному из рассчитанных ранее методом молекулярной механики значений, в то время как угол ψ может отклоняться от своего оптимального значения на $\pm 19^\circ$. Углы χ_1 в Tug4 и Phe6 принимают все три допустимых значения (± 60 и 180°), в то время как для угла χ_2 в Phe6 допустимы только положительные значения, равные 81° .

Исследованы изменения энергии нейропептидов во время молекулярной динамики в вакууме и водной среде. На рис.3 представлены графики изменения величин энергии полной энергии ($E_{\text{полн}}$) как суммы кинетической ($E_{\text{кин}}$) и потенциальной ($E_{\text{пот}}$) от времени по пикосекундной шкале.

Как видно из графиков за время симуляции характер флуктуации в вакууме не изменяется, а среднее значение потенциальной энергии монотонно уменьшается. Таким образом, исследуемые нейропептиды в вакууме находятся в стабильных по энергии состояниях, т.е. флуктуация температуры в указанном интервале не влияет на устойчивость конформаций нейропептидов. При переходе к водному окружению происходит резкое уменьшение полной энергии, достигая оптимального значения $-33,4$ кДж/моль (для аллатостатина IV) и $-36,9$ кДж/моль (для шистостатина V). Как следует из рис.3,б частота флуктуации кинетической и потенциальной энергии уменьшается; амплитуда атомного движения здесь меньше, чем в вакууме. Это можно объяснить тем, что определенные группы атомов нейропептидов, связываясь с молекулами воды, затрудняют ее движение.

Аллатостатин IV



Шистостатин V

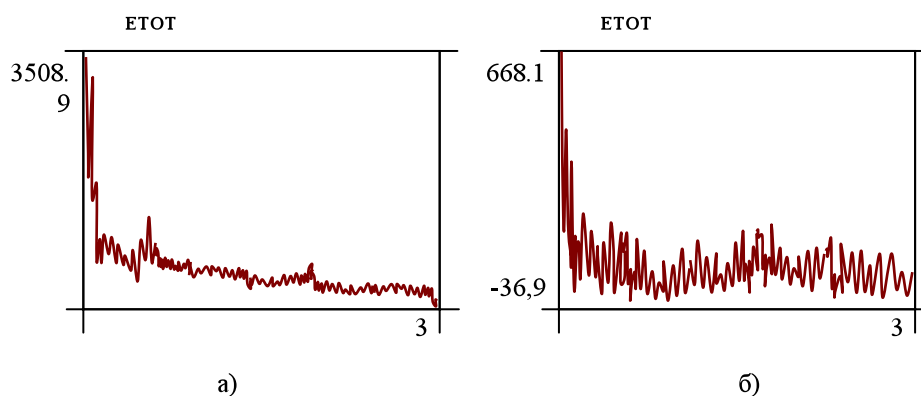


Рис. 3 Изменение энергии глобальной конформации нейропептидов в процессе молекулярной динамики в вакууме(а) и водной среде (б).

Обобщая результаты исследований можно утверждать:

- (а) участок Asp1(Gly1) - Tyr4 пептидной цепи нейропептидов обладает существенной конформационной подвижностью, что подтверждает результаты исследований, проведенных методом молекулярной механики;
- (б) фрагмент Tyr4-Leu8 образует β -поворот пептидной цепи, стабилизированный водородной связью между CO и NH группами остатков Tyr4 и Gly7, который не разрушается в процессе молекулярной динамики нейропептидов.

Полученные результаты могут быть использованы для установления структурно-функциональной взаимосвязи нейропептидов семейства аллатостатинов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Veelaert D., Devreese B., Schoofs L. et al. Isolation and characterization of eight myoinhibiting peptides from the desert locust, *Schistocerca gregaria*: new members of the cockroach allatostatin family // *Mol. Cell Endocrinol.*, 1996, v.122 (2), p.183-190
2. Veelaert D., Devreese B., Schoofs L. et al. Isolation and characterization of schistostatin-2 (11-18) from the desert locust, *Schistocerca gregaria*: a truncated analog of schistostatin-2 // *Regulatory peptides*, 1996, v.67 (3), p.195-199
3. Bendena W.G., Donly B.C., Tobe S.S. Allatostatins: A growing family of neuropeptides with structural and functional diversity, // *Ann.N.-Y.Academy of Sciences*, 1999, v.897, p.311-329
4. Edwards J.P., Audsley N., Marris G.C., Weaver R. The role of allatostatic and allatropic neuropeptides in the regulation of juvenile hormone biosynthesis in *Lacania oleracea*, // *Peptides*, 2001, v.22(2), p.255-261
5. Шноль Э.Э., Гривцов А.Г. и др. Метод молекулярной динамики в физической химии. М.: Наука, 1996
6. Allen M.P., Tildesley D.J. Computer simulation of liquids, Oxford: Clarendon Press, 2002
7. Шайтан К.В. Энергетическая поверхность и конформационная динамика молекул, // *Электрохимия*, 2003, т.39(2), с.212-219
8. Шайтан К.В., Сарайкин С.С. Метод молекулярной динамики. 1999, <http://www.moldyn.ru/library/md/default.htm>
9. <http://www.hyper.com>
10. Musayev M.A., Veliyeva L.I., Alieva I.N., Gojaev N.M. Spatial structure and conformational peculiarities of the allatostatin family neuropeptide // *Int. Biophysics Congress*, 2005, France, P-627
11. IUPAC-IUB Quantity, Units and Symbols in Physical Chemistry, Blackwell Scientific Publications, Oxford, v. 39, 1988

ALLATOSTATINLƏR AİLƏSİNİN NEUROPEPTIDLƏRİNİN MOLEKULYAR DİNAMİKASI

L.İ.VƏLİYEVƏ, M.A.MUSAYEV, İ.N.ƏLİYEVƏ, N.M.QOCAYEV

XÜLASƏ

Molekulyar dinamika üsulu ilə allatostatinlər ailəsinə mənsub neuropeptidlərin konformasiya mütəhərriqliyi tədqiq edilmişdir. Neuropeptidlərin molekulyar dinamikası vakuumda və verilmiş su molekulları əhatəsində hesablanmışdır. Axırını halda peptid tərkibində 190 su molekulu olan və periodik sərhədə malik düzbucaqlı yeşiyə salınmış və neuropeptidlərin əsas zəncirinin ikiüzlü bucaqlarının dəyişməsi kəmiyyətə qiymətləndirilmişdir.

**MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS OF THE
OF THE ALLATOSTATIN FAMILY NEUROPEPTIDES**

L.I.VELIYEVA, M.G.MUSAYEV, I.N.ALIEVA, N.M.GODJAYEV

SUMMARY

Molecular dynamics simulations were performed for allatostatin family neuropeptides. A single molecules were modeled in vacuum as well as in water. In the latter case they were surrounded by 190 water molecules and a periodic boundary conditions were applied. The permissible ranges of backbone dihedral angles of the neuropeptide molecules were evaluated.