

УДК 547.962:541.63

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ
МОЛЕКУЛЫ СОМАТОСТАТИН СЕМЕЙСТВА
АЛЛАТОСТАТИНОВ****Л.И.ВЕЛИЕВА, Н.А.ГАНИФАЕВА****Бакинский Государственный Университет
Lala_Veliyeva@rambler.ru, gomesh2006@mail.ru**

Методом теоретического конформационного анализа установлена пространственная структура нейропептида соматостатина, принадлежащего семейству аллатостатинов. На основе расчёта величины внутримолекулярной конформационной энергии проведена количественная оценка стабильности возможных конформационных состояний молекулы в условиях полярной среды.

Ключевые слова: аллатостатины, нейропептиды, пространственное строение, конформационный анализ.

Нейропептиды, выделяемые нейросекреторными клетками насекомых, играют ключевую роль в процессах онтогенеза насекомых [1-3]. Они участвуют в гормональной регуляции насекомых, ингибируя синтез и выделение ювенильных гормонов в процессе их метаморфоза. Интерес к исследованиям был обусловлен не только их ролью в репродуктивных процессах насекомых, но и появившимися в последние годы данными об их участии в нейропередаче и ингибировании перистальтического движения кишечника [4, 5]. Эксперименты с синтезированными аналогами аллатостатинов продемонстрировали высокую специфичность их действия и способность сохранять свою структуру на протяжении длительного периода развития насекомого.

Известно, что цикл развития насекомых проходит через три морфологически различающиеся стадии: развитие яйца, превращение его в личинку, переход последней в куколку и затем во взрослое насекомое (имаго) [6]. Весь этот метаморфоз протекает при участии биорегуляторов, выделяющихся нейросекреторными железами. К ним относятся гормоны, объединенные под общим названием "ювенильные гормоны" (от англ. juvenile - молодой) и целая группа гормонов линьки, получивших название экдистероидов [7]. Ювенильные гормоны образуются у личинок и

контролируют развитие насекомого лишь на ранних стадиях его развития. Именно на этой стадии многие насекомые наносят ощутимый ущерб окружающей среде уничтожая растения, в том числе и сельскохозяйственные, либо распространяя опасные заболевания.

Можно утверждать, что изучение геометрических параметров структуры молекулы соматостатина крайне необходимо для установления принципов функциональной активности природных нейропептидов. Такие исследования вносят существенный вклад в понимание взаимосвязи между структурой и функциями природных нейропептидов и открывают возможности для управления процессами синтеза и выделения ювенильных гормонов в процессе метаморфоза насекомых. Кроме того, изучение молекулярных механизмов ингибиторных свойств нейропептидов является важным и перспективным направлением исследований, на основе которых могут быть синтезированы более эффективные по сравнению с природными аналогами соединения.

Схема и метод расчета

Моделирование и исследование пространственного строения молекулы соматостатина проводилось на основе поэтапного расчета, включающего независимое изучение конформационных возможностей отдельных участков молекул и их перекрывающихся фрагментов. На рис.1 приведена линейная последовательность аминокислотных остатков, образующих первичную структуру нейропептида соматостатина. Схема разбиения на фрагменты произвольна и согласно результатам многочисленных расчетов не влияет на конечные результаты исследования [8-11].

Схема поэтапного расчета молекулы соматостатина включает независимое исследование ее три- и пентапептидных фрагментов (рис.1). Нулевые приближения для конформационных состояний фрагментов, используемые в минимизационном процессе, были составлены из *B*, *R*, *L* и *P* форм аминокислотных остатков *Gly*, *Tyr*, *Ser*, *Phe*, *Arg*, *Pro* и *Leu* при различных конформационных состояниях их боковых цепей, соответствующих низкоэнергетическим конформациям метиламидов *N*-ацетил- α -аминокислот [9].

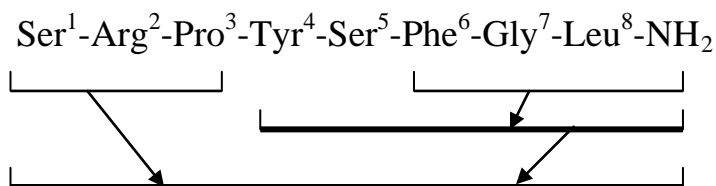


Рис.1. Схема расчета молекулы соматостатина

Процедура минимизации энергии проведена методом сопряженных градиентов, позволяющим отбирать "перспективные" для дальнейшего

расчета конформации на каждом его этапе. Критерий отбора основан на условии, согласно которому значение минимальной энергии заданной конформации (E) не должно превышать значение энергии ближних взаимодействий всех возможных конформеров (E_{\min}) в пределах выбранного участка молекулы на величину ΔE , т.е. $E - E_{\min} \leq \Delta E$. Величина ΔE выбрана путем анализа энергии ди-, три- и других типов межстаточных взаимодействий в олигопептидах и белках [8,10,11].

Трипептид *PHE-GLY-LEU-NH₂*. Начальные приближения для данного фрагмента представлены 280 конформационными состояниями, принадлежащими 4 возможным шейпам и 36 формам их пептидного остова. В табл.1 приведены энергетические характеристики более 25 конформаций, полученных после минимизации энергии при варьировании двугранных углов ω , φ , ψ и χ . В интервал конформаций с относительной энергией 0÷3 ккал/моль попадают ~ 49% рассчитанных структурных вариантов (табл.2). Низкоэнергетические конформации фрагмента принадлежат в основном шейпам *ef* и *ff*.

Таблица 1

**Низкоэнергетические конформации фрагмента
Phe-Gly-Leu-NH₂ молекулы соматостатин**

Фрагмент	Конформация	Шейп	Энергетические вклады, ккал/моль				
			$E_{\text{нев.}}$	$E_{\text{эл.}}$	$E_{\text{торс}}$	$E_{\text{полн.}}$	$E_{\text{отн.}}$
<i>Phe-Gly-Leu-NH₂</i>	B_2RB_3	<i>ef</i>	-9.08	1.67	1.13	-6.27	0
	R_2PR_3		-9.22	1.69	1.50	-6.02	0.25
	R_3PB_3		-7.74	1.61	0.97	-5.16	1.11
	B_3RR_3		-7.86	1.92	1.27	-4.68	1.59
	R_2LL_2		-7.63	2.05	1.59	-3.99	2.28
	L_2RB_1		-8.07	2.01	2.18	-3.88	2.39
	B_3PR_3	<i>ff</i>	-8.33	1.50	1.22	-5.62	0.65
	B_3PB_3		-8.48	1.41	1.55	-5.53	0.74
	R_2RB_3		-8.16	1.81	1.09	-5.26	1.01
	R_3RR_2		-8.36	1.95	1.30	-5.11	1.16
	L_3PB_2		-7.70	1.53	1.61	-4.54	1.73
	L_3PR_3		-7.22	1.45	1.28	-4.50	1.77
	R_2BL_3		-7.30	1.65	1.45	-4.19	2.08
	B_2LL_2		-7.31	1.55	2.30	-3.45	2.82
	R_3LB_1	<i>ee</i>	-9.01	1.97	1.26	-5.78	0.49
	B_3BB_3		-8.02	1.58	1.40	-5.04	1.23
	L_3BB_1		-8.49	1.67	1.80	-5.02	1.25
	B_3BB_1		-7.73	1.55	1.62	-4.56	1.71
	L_3BR_3		-7.78	1.74	1.60	-4.45	1.82
	R_3LR_1		-6.77	2.20	1.22	-3.35	2.92
	B_2LB_2	<i>fe</i>	-8.74	1.57	1.81	-5.36	0.91
	R_2BB_2		-8.01	1.64	1.06	-5.31	0.96
	R_2BR_2		-7.66	1.63	0.89	-5.14	1.13
	B_2LR_2		-8.35	1.66	1.56	-5.13	1.14
	L_3LB_2		-6.78	1.88	1.50	-3.41	2.86

Таблица 2

**Энергетическое распределение конформаций фрагмента
*Phe-Gly-Leu-NH₂***

	Шейп	Интервал энергии E _{отн.} (ккал/моль)					
		0 - 1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	> 5
1.	<i>ff</i>	5	20	11	8	5	5
2.	<i>ef</i>	4	9	11	6	12	6
3.	<i>ee</i>	1	8	10	6	3	15
4.	<i>fe</i>	2	6	10	9	6	18

Пентапептид *TYR-SER-PHE-GLY-LEU-NH₂*. Начальные приближения для данного фрагмента составлены из стабильных конформаций трипептида *Phe-Gly-Leu-NH₂* и монопептидов *Tyr* и *Ser*. Для минимизации полной конформационной энергии фрагмента составлен 441 структурный вариант, принадлежащий 16 шейпам и 72 формам основной цепи. Конформационные особенности фрагмента обусловлены объемными боковыми цепями остатков *Tyr⁴*, *Phe⁶*, *Leu⁸*. Поэтому наибольшее количество низкоэнергетических конформаций (~20) с относительной энергией 0-5 ккал/моль характеризуется структурой свернутого типа (табл.3), обозначенного шейпами *ffff* и *efff* их пептидного остова.

Таблица 3

**Энергетическое распределение конформаций
пента- и трипептидных фрагментов**

№	Шейп	Интервал энергии E _{отн.} (ккал/моль)					
		0 - 1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	5 - 10
<i>Tyr⁴-Ser⁵-Phe⁶-Gly⁷-Leu⁸-NH₂</i>							
1.	<i>efff</i>	-	-	-	1	4	28
2.	<i>ffff</i>	-	-	2	6	8	14
3.	<i>eeff</i>	-	1	-	2	5	37
4.	<i>feff</i>	-	-	-	-	-	34
5.	<i>efee</i>	-	-	1	-	1	11
6.	<i>ffee</i>	1	-	1	1	2	6
7.	<i>eeee</i>	-	-	-	2	2	12
8.	<i>feee</i>	-	-	-	1	1	9
9.	<i>efef</i>	-	-	-	-	-	4
10.	<i>ffef</i>	-	-	-	1	1	1
11.	<i>eeef</i>	-	-	-	-	3	20
12.	<i>fefe</i>	-	-	-	-	1	17
13.	<i>eeef</i>	-	-	-	-	1	7
14.	<i>feef</i>	-	-	-	-	-	8
15.	<i>effe</i>	-	-	-	-	-	4
16.	<i>fffe</i>	-	-	-	-	2	4
<i>Ser¹-Arg²-Pro³</i>							
1.	<i>fe</i>	4	-	-	-	-	-
2.	<i>ee</i>	2	-	2	-	-	-

Полностью свернутые структуры на 3 ккал/моль уступают самой низкоэнергетической конформации фрагмента, принадлежащей шейпу *ffee*. Полузвернутые формы основной цепи, представленные шейпом *eeff*, характеризуются 8 конформационными состояниями с относительной энергией 0-5 ккал/моль. Отличительная особенность структур этого типа – выгодные дисперсионные взаимодействия аминокислотных остатков *Tyr*⁴ и *Phe*⁶, обусловленные параллельным расположением их ароматических колец, расстояние между С атомами которых составляет ~2,6Å. Этот фактор обеспечивает максимальный вклад от энергии их дисперсионных взаимодействий, равный -4,7ккал/моль. Полностью вытянутые структуры фрагмента, принадлежащие шейпу *eeee*, также как и структуры других шейпов энергетически менее предпочтительны. Однако выводы о их роли в формировании пространственной организации молекул дростатинов можно сделать на основе конформационного анализа всей молекулы. Поэтому низкоэнергетические представители всех рассмотренных форм и шейпов основной цепи были включены в дальнейшие расчеты.

Трипептид *SER-ARG-PRO*. Исходный набор структурных вариантов, принадлежащих 4 шейпам и 16 формам основной цепи трипептида, включал 12 конформаций для фрагмента *Ser*¹-*Arg*²-*Pro*³. Количественная оценка вкладов межостаточных взаимодействий показала, что у фрагмента *Ser*¹-*Arg*²-*Pro*³ с разветвленной формой основной цепи (шейп *ee*) отсутствуют какие-либо взаимодействия между первым и третьим остатками. Поэтому такие конформации маловероятны. В предпочтительных конформациях исследуемого трипептида с свернутыми формами основной цепи (шейп *fe*) реализация дополнительных стабилизирующих взаимодействий осуществляется без значительного ослабления контактов в пределах дипептидных взаимодействий и заметного изменения их геометрических параметров. Таким образом, различие в пространственной организации исследуемых фрагментов связано не с геометрией предпочтительных структур, а с их конформационными особенностями.

Соматостатин. Результаты фрагментарного анализа были положены в основу расчета структуры всей молекулы (табл.4-6). Энергия рассчитанных структур близка к сумме величин соответствующих состояний свободных фрагментов, так как они представляют собой сочетания выгодных конформационных состояний этих фрагментов. Сопоставление полученных данных свидетельствует, что решающее значение в стабилизации пространственной структуры молекулы принадлежат дисперсионным взаимодействиям, характеризующим плотность упаковки аминокислотной последовательности.

Наиболее компактные структуры в меньшей мере удовлетворительны в отношении электростатических контактов, менее чувствительных к межатомным расстояниям.

Стабилизирующий эффект от энергии образования водородных связей также невелик, поскольку вычислительный эксперимент был проведен с учетом водной среды, где водородные связи ослаблены. Согласно результатам расчета, полученным после минимизации энергии молекул в пространстве независимых геометрических параметров – двугранных углов ω , φ , ψ и χ , наиболее предпочтительные конформации, имеющие шейки основной цепи *fefeff* и *feffff*. Их преимущество перед другими рассчитанными конформациями связано, главным образом с тем, что в них реализуются эффективные стабилизирующие взаимодействия между удаленными в последовательности остатками.

Таблица 4

Низкоэнергетические конформации молекулы соматостатин

Шейп	Конформация	Энергетические вклады (ккал/моль)				
		$E_{нев}^*$	$E_{эл.}$	$E_{торс}$	$E_{полн}$	$E_{отн.}$
Соматостатин						
<i>fefeff</i>	PBRB ₁ R ₁ B ₃ PR ₃₂₂₂ **	-31.2	-1.1	3.8	-28.5	0.3
	RBRB ₁ R ₁ B ₃ PR ₃₂₂₂	-31.2	-0.7	4.5	-27.4	1.3
	PBRB ₃ R ₁ R ₃ RR ₂₂₂₂	-28.7	-0.4	2.3	-26.9	1.9
	PBRB ₃ R ₂ B ₃ PR ₃₂₂₂	-27.6	-0.7	1.7	-26.6	2.1
<i>fefeff</i>	RBRB ₁ R ₁ B ₃ PR ₃₂₂₂	-36.6	3.6	4.3	-28.7	0.0
	PBRB ₁ R ₁ B ₃ PR ₃₂₂₂	-35.5	3.4	3.7	-28.4	0.4
	PBRB ₃ R ₁ R ₃ RR ₂₂₂₂	-31.8	4.5	2.2	-25.0	3.7
<i>feffff</i>	PBRR ₁ R ₁ R ₃ RR ₂₂₂₂	-32.9	3.6	2.6	-26.7 -26.2 -26.1 -25.6	2.0
	RBRR ₁ R ₁ R ₃ RR ₂₂₂₂	-33.1	3.9	3.0		2.5
	PBRR ₁ R ₁ B ₃ PR ₃₂₂₂	-32.9	3.5	3.3		2.6
	RBRR ₁ R ₁ B ₃ PR ₃₂₂₂	-33.1	3.8	3.7		3.2

* Энергия водородных связей включена в $E_{нев}$.

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

Таблица 5

Двугранные углы (град) молекулы соматостатин

Аминокислота	К о н ф о р м а ц и и					
	<i>Ser</i> ¹	$\varphi=138$ $\psi=-72$ $\omega=181$	$\varphi=-70$ $\psi=-73$ $\omega=175$	$\varphi=137$ $\psi=-72$ $\omega=180$		
<i>Arg</i> ²	$\varphi=125$ $\psi=164$ $\omega=175$	$\varphi=109$ $\psi=161$ $\omega=179$	$\varphi=94$ $\psi=162$ $\omega=175$			
<i>Pro</i> ³	$\psi=-42$ $\omega=179$	$\psi=-45$ $\omega=177$	$\psi=-54$ $\omega=180$ $\chi=154$			
<i>Tyr</i> ⁴	$\varphi=-121$ $\psi=160$ $\omega=183$	$\varphi=-118$ $\psi=161$ $\omega=182$	$\varphi=101$ $\psi=-38$ $\omega=177$			
<i>Ser</i> ⁵	$\varphi=-91$ $\psi=-32$ $\omega=191$	$\varphi=-89$ $\psi=-31$ $\omega=193$	$\varphi=-93$ $\psi=-30$ $\omega=174$			
<i>Phe</i> ⁶	$\varphi=-70$ $\psi=145$ $\omega=189$	$\varphi=-69$ $\psi=145$ $\omega=189$	$\varphi=-75$ $\psi=-48$ $\omega=178$			
<i>Gly</i> ⁷	$\varphi=70$ $\psi=-72$ $\omega=181$	$\varphi=71$ $\psi=-74$ $\omega=180$	$\varphi=-67$ $\psi=-57$ $\omega=180$			
<i>Leu</i> ⁸	$\varphi=-116$ $\psi=-51$ $\omega=174$	$\varphi=-117$ $\psi=-52$ $\omega=174$	$\varphi=-101$ $\psi=-52$ $\omega=178$			
Форма	PBRB ₁ R ₁ B ₃ PR ₃₂₂₂	RBRR ₁ R ₁ R ₃ PR ₃₂₂₂	PBRR ₁ R ₁ R ₃ RR ₂₂₂₂			

Анализ вкладов межостаточных взаимодействий (табл.6) показал, что центром дисперсионной стабилизации в низкоэнергетических конформациях может быть остаток *Phe*⁶. Суммарная энергия взаимодействий *Phe*⁶ с *Tyr*⁴, *Ser*⁵ и *Leu*⁸ составляет -3.61 ккал/моль.

Таблица 6

Вклады межстаточных взаимодействий (ккал/моль) в полную энергию наиболее предпочтительных конформаций молекулы соматостатин

<i>SER</i> ¹	<i>ARG</i> ²	<i>PRO</i> ³	<i>TYR</i> ⁴	<i>SER</i> ⁵	<i>PHE</i> ⁶	<i>GLY</i> ⁷	<i>LEU</i> ⁸	
1.37	-3.17	-0.45	-0.11	-0.04	-0.01	0.00	-0.01	<i>SER</i> ¹
1.35	-0.43	-0.50	-0.08	-0.06	-0.02	0.01	0.00	
1.36	-3.25	-0.29	-0.09	-0.08	0.00	0.00	0.00	
	0.76	-3.53	-2.63	-0.21	-0.04	0.00	-1.39	<i>ARG</i> ²
	0.74	-4.48	-3.49	0.78	0.11	-0.09	-2.66	
	0.73	-0.30	-2.12	-0.43	-1.28	0.01	0.01	
		0.21	-2.03	-0.17	-0.02	0.00	0.01	<i>PRO</i> ³
		0.24	-2.51	-0.18	-0.02	0.00	0.01	
		0.94	-3.05	0.13	-1.75	-1.20	-0.33	
			-0.04	-1.99	-2.45	-0.25	-1.25	<i>TYR</i> ⁴
			0.11	-2.06	-3.08	-0.24	-0.97	
			0.04	-3.29	-1.81	-0.95	-1.71	
				-0.83	-2.57	-0.47	-1.16	<i>SER</i> ⁵
				-0.82	-2.46	-0.47	-1.09	
				-0.81	-2.31	-0.88	-1.50	
					0.60	-0.33	-1.39	<i>PHE</i> ⁶
					0.62	-0.34	-1.51	
					0.14	-0.23	-0.83	
						1.30	-0.70	<i>GLY</i> ⁷
						1.29	-0.68	
						1.34	-0.55	
							0.14	<i>LEU</i> ⁸
							0.14	
							0.23	

*Примечание: Приведены данные для глобальных конформаций

Выводы

1. Методом теоретического конформационного анализа установлены низкоэнергетические конформационные состояния молекулы соматостатина.
2. Впервые установлены элементы пространственного строения в состоянии конформационного равновесия - спиральные участки на С-концевом фрагменте и лабильный N-концевой участок. Конформационные состояния последнего разделены невысокими потенциальными барьерами, благодаря чему возможно смещение равновесия в зависимости от условий окружающей среды и специфических межмолекулярных взаимодействий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Konopinska D., Rosinski G., Sobotka W. "Insect peptide hormones, an overview of the present literature". Int. J. Pept. Protein Res., 1992, v.39, №1, p.1-11
2. Menn J.J.(Ed.) "Insect Neuropeptides: Chemistry, Biology and Action". Amer. Chem. Soc., Washington D.C., 1991, 254 p.
3. Rankin S.M., Palmer J.O., Yagi K.J., Scott G.L., Tobe S.S. "Allatostatic and allatropic factors in the brain of the desert locust, schistocerca-gregaria". Belgian Journal of Zoology, 1995, v.125, №1, p.243-249.
4. Rachinsky A., Zhang J., Tobe S.S. "Signal transduction in the inhibition of juvenile hor-

- ... mone biosynthesis by allatostatins". Mol. Cell Endocrinol., 1994, v.105, №1, p.89-96.
5. Stay B., Fairbairn S., Yu C.G. "Role of allatostatins in the regulation of juvenile hormone synthesis". Arch. Insect. Biochem. Physiol., 1996, v.32, №3-4, p.287-297.
 6. Veelaert D., Schoofs L., Tobe S.S., Yu C.G., Vullings H.G.B., Couillaud F., Deloof A. "Biosynthesis and release of juvenile-hormone during the reproductive cycle of the ring-legged earwing". Comparative Biochem. and Phys. (pharmacology, toxicology and endocrinology), 1995, v.110, №3, p.241-251
 7. Hayes T.K., Guan X.C., Johnson V., Strey A., Tobe S.S. "Juvenile-hormone binding components of locust fat-body". Arch. Insect Biochem. and Phys., 1995, v.28, №3, p.291-309
 8. Попов Е.М. Структурная организация белков, М.: Наука, 1989, 352 с.
 9. Levis P.N., Momany F.A., Scheraga H.H. "VI. Conformational energy analysis of the N-acetyl N-methyl amides of the twenty naturally occurring amino acids". Israel J. Chem., 1973, v.11, p.121-152 .
 10. Godjaev N.M., Alieva I.N., Akyuz S., Aliev D.I. "Conformational analysis of Argiopine Molecule obtained from "Argiope Lobata" Spider Venom". J. of Mol. Struc., 1995, v.350, p.173-183.
 11. Alieva I.N., Veliyeva L.I., Musayev M.A., Gojayev N.M. "Conformational features of the Dippu-Ast 8 neuropeptide from the cockroach Diploptera Punctata" Protein and Peptide Letters, 2006, v.13, №10, p.1007-1015.

ALLATOSTATİNLƏR AİLƏSİNƏ MƏNSUB SOMATOSTATİN MOLEKULUNUN FƏZA QURULUŞUNUN MODELƏŞDİRİLMƏSİ

L.İ.VƏLİYEVƏ, N.Ə.HƏNİFƏYEVƏ

XÜLASƏ

Allatostatinlər ailəsinə mənsub olan somatostatin molekulunun nəzəri konformasiya analizi üsulu ilə fəza quruluşu tədqiq edilmişdir. Molekuldaxili konformasiya enerjisinin ölçülməsi nəticəsində polyar mühitdə molekulun bütün mümkün stabil konformasiya halları kəmiyyətə qiymətləndirilmişdir.

Açar sözlər: allatostatinlər, neuropeptidlər, fəza quruluşu, konformasiya analizi.

MODELING OF THE SPATICAL STRUCTURE OF THE MOLECULE OF SOMATOSTATIN BELONGING TO ALLATOSTATIN FAMILY

L.I.VALIYEVƏ, N.A.HANIFAYEVƏ

SUMMARY

The spatial structure of the somatostatin neuropeptide from allatostatin family has been established by a theoretical conformational analysis method. On the basis of the intramolecular conformational energy calculation, the quantitative evaluation of the possible conformational states of the molecule in water solution has been carried out.

Key words: allatostatins, neuropeptides, structure, conformational analyses.

Поступила в редакцию: 29.09.2011 г.

Принята к печати: 05.03.2012 г.