



УДК 577.112.825.089:541.63

© 1994 А. А. Колобов, Н. И. Колодкин,  
Л. В. Оленникова, А. М. Ищенко, О. А. Кауров

## КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ И ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФРАГМЕНТА 285—292 ИММУНОГЛОБУЛИНА G И ЕГО АНАЛОГОВ

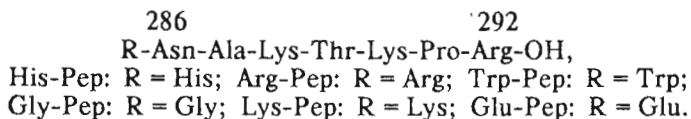
*Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург*

Ключевые слова: иммуноглобулин G; пептиды; конформационный анализ; C1q-компонент комплемента.

Выполнен теоретический конформационный анализ фрагмента 285—292 иммуноглобулина G человека (His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg) и его аналогов, содержащих вместо остатка His в положении 1 остаток Arg, Glu, Gly, Lys и Trp. Проведено спектрополяриметрическое исследование этих пептидов. Показано, что аналоги обладают различной активностью в тесте C1q-опосредованного гемолиза эритроцитов. Со- поставление наборов низкоэнергетических структур исследованных соединений позволило предложить модель «биологически активной» конформации, характерной для молекулы при связывании с C1q-компонентом комплемента.

Регуляция активности комплемента — одна из важных эффекторных функций иммуноглобулинов (Ig). Лукас с соавт. [1], исследуя явление ингибирования IgG C1q-опосредованного гемолиза, установили, что за этот вид активности ответствен фрагмент 281—292 CH<sub>2</sub>-домена. Ими же было высказано предположение о важности положительно заряженных аминокислотных остатков (His-285, Lys-288, Lys-290, Arg-292) для связывания с C1q-компонентом комплемента. Ранее нами с целью выяснения вопроса о роли остатка His-285 был синтезирован пептид последовательности 285—292 IgG (His-Pep) и ряд его аналогов, содержащих вместо остатка His остатки Arg, Trp, Gly, и изучена их биологическая активность [2].

В настоящем сообщении излагаются результаты работ по дальнейшему изучению роли положительно заряженных аминокислотных остатков фрагмента 285—292 в процессе взаимодействия с C1q-компонентом комплемента. Методами теоретического конформационного анализа в попарно-аддитивном приближении исследовано пространственное строение ранее полученных аналогов (His-Pep, Arg-Pep, Trp-Pep, Gly-Pep), а также новых (Lys-Pep, Glu-Pep), в которых His-285 заменен на лизин и глутаминовую кислоту соответственно:



Оптимальные конформации октапептида His-Pep и его аналогов и их энергетические параметры,  $(E - E_{\min}) < 7$  ккал/моль

Аналог	Номер конформации	$\Delta E$ , ккал/моль	Конформационное состояние*
His-Pep	1	0	$L_{31}R_{31}BR_{2222}R_{12}B_{2223}RR_{3223}$
Lys-Pep	1	0	$L_{2222}L_{31}BR_{2222}R_{12}B_{2223}RR_{3223}$
	2	1,48	$L_{2222}R_{31}BR_{3222}R_{12}B_{2223}RR_{3223}$
	3	1,62	$B_{2222}R_{31}BR_{3222}R_{12}B_{2223}RR_{3223}$
	4	2,43	$B_{2222}L_{31}BR_{2222}R_{12}B_{2223}RR_{3223}$
	5	3,81	$R_{2222}R_{31}BR_{2222}R_{12}B_{3222}RR_{3223}$
	6	4,26	$R_{2222}B_{23}BB_{2222}L_{32}B_{2223}RR_{3221}$
	7	4,58	$B_{3222}B_{31}RR_{2222}R_{12}B_{2223}RR_{3222}$
	8	4,92	$R_{2222}B_{23}RR_{2222}R_{12}B_{2223}RR_{3223}$
	9	5,44	$R_{2222}B_{23}RB_{2222}L_{32}B_{3223}RR_{3221}$
	10	6,27	$B_{2222}R_{31}LR_{2222}R_{12}B_{2223}RR_{3222}$
	11	6,5	$R_{2222}L_{31}BR_{2222}R_{12}B_{2223}RR_{3223}$
	12	6,84	$R_{2222}R_{33}BR_{2222}R_{12}B_{3222}RR_{2221}$
Glu-Pep	1	0	$I_{221}R_{31}BR_{3223}R_{12}B_{2223}RR_{3223}$
	2	6,51	$B_{221}B_{33}LL_{2221}R_{31}B_{3222}RR_{3223}$
Trp-Pep	1	0	$L_{13}R_{31}BR_{3222}R_{12}B_{2223}RR_{3223}$
	2	5,01	$B_{31}B_{31}LL_{2222}R_{31}B_{3222}RR_{3223}$
	3	5,57	$L_{13}L_{23}RR_{2222}R_{11}B_{2223}RR_{3223}$
	4	6,18	$R_{21}B_{23}RR_{2222}R_{12}B_{2223}RR_{3223}$
	5	6,45	$B_{23}R_{31}LR_{3222}R_{12}B_{2223}RR_{3223}$
	6	6,79	$B_{21}B_{31}HB_{3222}R_{32}B_{2223}RR_{3223}$
Arg-Pep	1	0	$L_{2221}R_{31}BR_{3222}R_{12}B_{2223}RR_{2221}$
	2	0,66	$L_{2223}L_{31}BR_{2222}R_{12}B_{2223}RR_{3223}$
	3	2,18	$R_{2223}R_{31}BR_{2222}R_{12}B_{3222}RR_{3223}$
	4	4,41	$R_{3223}B_{23}BR_{2222}R_{12}B_{3222}RR_{3221}$
	5	4,71	$R_{2223}R_{31}BR_{2222}B_{32}B_{2223}RR_{3223}$
	6	5,38	$B_{2223}R_{31}LR_{2222}R_{12}B_{2223}RR_{3222}$
	7	5,59	$R_{2221}B_{23}RR_{2222}R_{12}B_{2223}RR_{3223}$
	8	6,49	$R_{2121}B_{31}BL_{2222}R_{32}B_{2223}RR_{3223}$
	9	6,50	$R_{2223}B_{31}LR_{2222}R_{32}B_{2223}RR_{3223}$
	10	6,59	$B_{3322}B_{33}LL_{3222}R_{31}B_{3222}RR_{2223}$
	11	6,80	$R_{2223}L_{31}BR_{2222}R_{11}B_{2223}RR_{3223}$
Gly-Pep	1	0	$RB_{23}RR_{3222}B_{32}H_{2223}RR_{3223}$
	2	2,27	$RB_{23}RR_{3222}B_{32}L_{2223}RR_{3223}$
	3	3,21	$LB_{23}RR_{3222}B_{32}L_{2223}RR_{3223}$
	4	3,88	$RB_{23}RR_{2222}B_{32}B_{2223}RR_{3223}$
	5	5,11	$RR_{31}BR_{2222}R_{12}B_{3222}RR_{2323}$
	6	5,5	$RR_{32}BR_{2222}B_{32}B_{2221}RR_{3223}$
	7	6,1	$RB_{23}BR_{3222}R_{12}B_{3222}RR_{3223}$
	8	6,27	$RB_{31}BL_{3222}R_{31}B_{3222}RR_{3223}$
	9	6,47	$BB_{23}RR_{3222}B_{22}B_{2223}RR_{2223}$
	10	6,61	$RB_{31}RB_{3222}L_{32}B_{2223}RR_{3223}$
	11	6,93	$BR_{31}BR_{2222}B_{32}B_{2223}RR_{2223}$

\* Конформационное состояние остатков характеризуется с помощью идентификатора типа  $X_{ij}...$  [13].

Энергетические вклады (ккал/моль) невалентных ( $U_{нв}$ ), электростатических ( $U_{эл}$ ), торсионных взаимодействий ( $U_{торс}$ ) и водородных связей ( $U_{вс}$ ) для предпочтительных конформаций исследованных октапептидов

Аналог	Номер конформации	$U_{нв}$	$U_{вс}$	$U_{эл}$	$U_{торс}$	$U_{общ}$
His-Pep	1	-46,26	-8,68	43,67	3,61	-7,66
Lys-Pep	1	-42,53	-7,41	69,26	3,84	23,16
	2	-45,09	-8,00	74,03	3,70	24,64
Glu-Pep	1	-42,84	-9,92	2,94	6,11	-43,71
Arg-Pep	1	-46,55	-9,09	69,88	4,96	19,20
	2	-43,32	-7,78	66,49	4,47	19,86
Trp-Pep	1	-47,64	-9,20	44,05	3,60	-9,19
Gly-Pep	1	-41,54	-7,79	44,42	3,98	-0,93
	2	-40,40	-7,76	44,12	5,38	1,34

Проведен также химический синтез этих соединений, изучены их спектрополяриметрические свойства и гемолитическая активность.

Теоретический конформационный анализ фрагмента 285—292 из последовательности  $CH_2$ -домена IgG, а также аналогов этого фрагмента проводился в два этапа. На первом этапе исследовались конформационные возможности модельных пептидов Gly-(Ala)<sub>5</sub>-Pro-Ala (для Gly-Pep) и (Ala)<sub>6</sub>-Pro-Ala (для остальных октапептидов). Начальные приближения формировались комбинированием локальных минимумов конформационных карт дипептидов остатков Ala, Gly и Pro (для модельного пептида Gly-(Ala)<sub>5</sub>-Pro-Ala выбирались 972 стартовые конформации, а для второго модельного пептида — 729). Для каждого модельного пептида, используя критерий  $E - E_{\min} \leq 10$  ккал/моль ( $E_{\min}$  — абсолютный минимум конформационной энергии пептида), отобрали низкоэнергетические конформации пептидного остова, значения торсионных углов которых были положены в основу дальнейших расчетов. На втором этапе был проведен поиск оптимальной взаимной ориентации боковых цепей каждого из шести октапептидов путем замены остатков Ala в модельных пептидах на соответствующие аминокислотные остатки. Углы  $\chi_1$  для боковых цепей аминокислотных остатков менялись с шагом в 30°. Таким образом, для каждого двугранного угла  $\chi$  рассчитывалось 12 рогамеров.

В результате расчета для каждого аналога был получен набор оптимальных конформаций, из которых отобрали низкоэнергетические. Энергетические параметры оптимальных конформаций изучаемых соединений, попадающие в интервал энергий 0—7,0 ккал/моль, представлены в табл. 1 и 2. Необходимо отметить, что, согласно расчетам, низкоэнергетические конформации октапептидов His-Pep, Glu-Pep и Trp-Pep характеризуются резкой дифференциацией по энергии. У этих пептидов в интервал энергии 0—7,0 ккал/моль попадает лишь одна, две и шесть конформаций соответственно.

В табл. 1 приведено сопоставление наборов низкоэнергетических структур исследуемых октапептидов. Оказалось, что все аналоги, кроме Gly-Pep, имеют сходную структуру пептидного остова фрагмента 3—8 во всем наборе конформаций в интервале энергий 0—4 ккал/моль — BRRBRR. Более того, конформации октапептидов His-Pep, Arg-Pep, Glu-Pep и Trp-Pep, соответствующие глобальному минимуму энергии, имеют форму основной цепи LRBRRBRR. Эта же конформация остова входит в число низкоэнергетических для пептида Lys-Pep. Указанный тип структуры отсутствует среди расчетных конформаций пептида Gly-Pep в интервале энергий 0—7 ккал/моль.

Геометрическое подобие структур основной цепи у изучаемых соединений

Сравнение конформации октапептида природной последовательности His-Per с конформациями других исследованных октапептидов и тафцина

Аналог	$\Delta E$ , ккал/моль	Номер конформации	$D_{1-8}$	$D_{3-8}$	$D_{5-8}$
			$\text{Å}^2$		
Lys-Per	0	1	4,59	0,7	0,15
	1,48	2	0,12	0,08	0,01
	1,62	3	0,12	0,08	0,01
	2,43	4	4,80	0,65	0,24
Glu-Per	0	1	0,29	0,12	0,12
Arg-Per	0	1	0,24	0,12	0,04
	0,66	2	4,42	0,67	0,17
	2,18	3	1,47	1,18	0,54
Trp-Per	0	1	0,07	0,04	0,02
Gly-Per	0	1	6,15	4,15	0,37
	2,27	2	6,09	4,34	0,37
Тафцин	0,5	2	—	—	0,23

было подтверждено с помощью программы пространственного совмещения конформаций путем минимизации средних квадратов отклонений  $D$  координат  $C^\alpha$ - и  $C^\beta$ -атомов. Сравнение, проведенное по всем  $C^\alpha$ - и  $C^\beta$ -атомам, выявило пространственное сходство наиболее низкоэнергетических конформаций ( $D \leq 0,3 \text{ \AA}^2$ ) природного пептида, аргининового, глутаминового, триптофанового аналогов (табл. 3) и конформаций 2 и 3 пептида Lys-Per. При сравнении конформации остова на участке 3—8 аминокислотной последовательности пространственное подобие подтверждается для всего набора низкоэнергетических структур этих соединений в интервале энергий  $\Delta E = 3$  ккал/моль, тогда как конформация пептидного остова глицинового аналога на участке Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg значительно отличается от пространственного строения низкоэнергетических конформеров других октапептидов ( $D \geq 4,0 \text{ \AA}^2$ ).

Поскольку ранее было установлено, что октапептиды His-Per и Arg-Per обладают ингибирующей активностью в тесте Clq-опосредованного гемолиза эритроцитов, а аналог Gly-Per практически неактивен в данном тесте [2], можно предположить, что биологически активной конформацией фрагмента 3—8 является структура BRRBRR. Если это верно, то наличие указанного типа структуры в наборе низкоэнергетических конформаций для пептидов Glu-Per и Lys-Per должно было бы способствовать проявлению ингибирующей активности у этих аналогов, несмотря даже на наличие у пептида Glu-Per отрицательного заряда в N-концевой части молекулы.

Учитывая вышеприведенные соображения, мы провели химический синтез этих соединений и изучили их гемолитическую активность. Результаты тестирования подтвердили сделанное предположение: оба пептида имеют ярко выраженную способность к ингибированию гемолиза эритроцитов (см. табл. 4). В связи с этим выделение структуры остова фрагмента 3—8 BRRBRR как биологически активной, т. е. ответственной за взаимодействие с рецептором, по-видимому, оправданно.

Рис. 1. Стереорезультаты наиболее вероятных конформаций октапептидов Lys-Pep (а) и His-Pep (б)

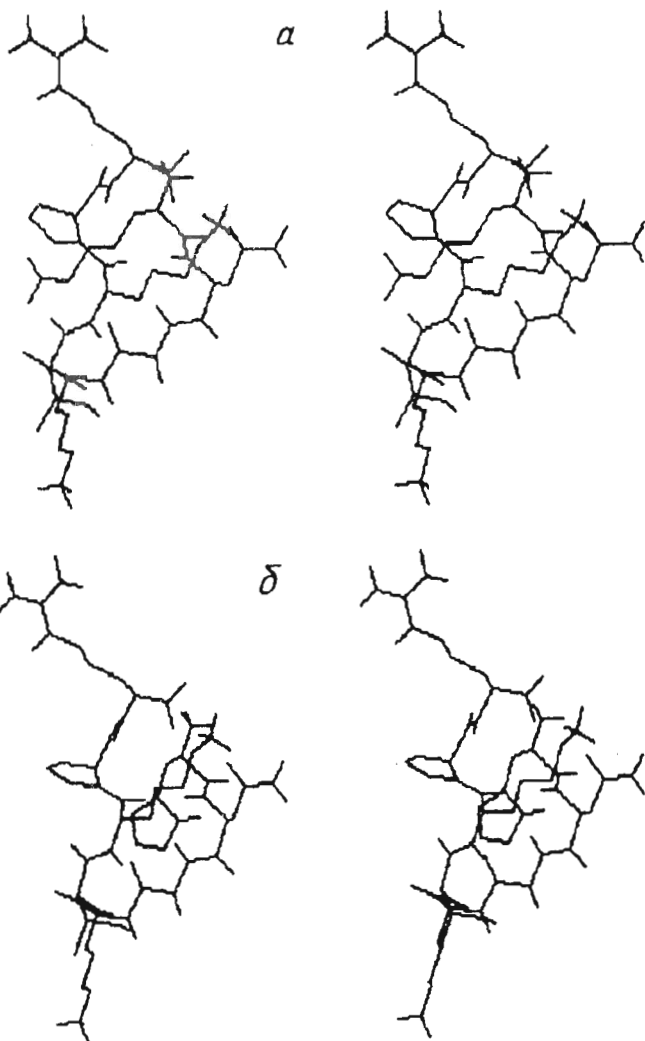


Рис. 1

Рис. 2. Спектры КД исследованных октапептидов в воде: 1 — His-Pep; 2 — Lys-Pep; 3 — Arg-Pep; 4 — Glu-Pep; 5 — Trp-Pep; 6 — Gly-Pep

Рис. 3. Спектры КД исследованных октапептидов в трифторэтанолу: 1 — His-Pep; 2 — Lys-Pep; 3 — Arg-Pep; 4 — Glu-Pep; 5 — Trp-Pep; 6 — Gly-Pep

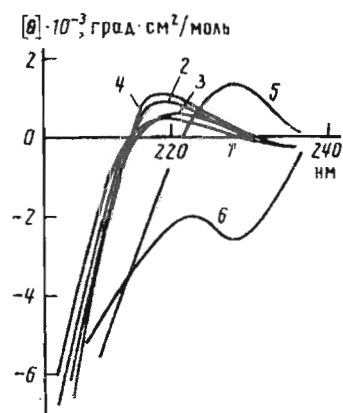


Рис. 2

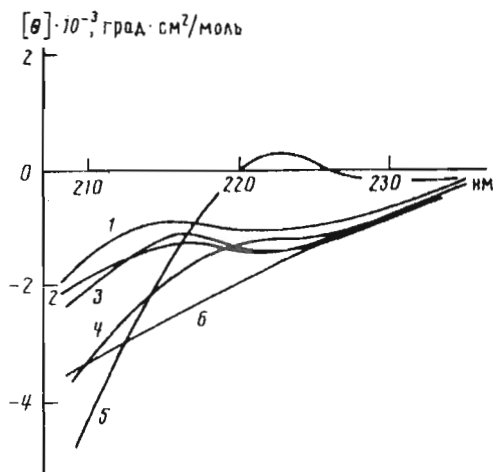


Рис. 3

Влияние октапептида His-Пер и его аналогов на систему комплемента\*

Пептид	Убыль комплемента, %	Активность относительно His-Пер, %
His-Пер	13,9	100
Lys-Пер	19,0	137
Glu-Пер	22,0	163
Arg-Пер	11,0	79
Тафцин	7,0	50
Trp-Пер	2,8	20
Gly-Пер	2,0	14

\* Изучение биологической активности природного октапептида (His-Пер) и его аналогов проводилось по методике, описанной в [13].

Анализ геометрических параметров наиболее низкоэнергетических конформаций показал, что у всех аналогов, за исключением глицинового, для конформации остова типа LRBRRRR характерен  $\beta$ -изгиб типа I [4]. Этот изгиб образуется центральными остатками Lys<sup>4</sup> и Thr<sup>5</sup> и стабилизируется водородной связью Lys<sup>6</sup>NH ... OCA1a с расстоянием Н...О 2,5 Å и углом ONH = 135° (рис. 1).

Спектры кругового дихроизма (КД) изучаемых соединений в воде и трифторэтаноле подтверждают сделанные нами выводы о сходстве конформационного строения пептидов — аналогов фермента 285—292 IgG, обладающих биологической активностью в использованной нами тест-системе. Спектры КД в воде можно разбить на три группы (см. рис. 2). К первой группе принадлежат спектры биологически активных октапептидов His-Пер, Arg-Пер, Glu-Пер и Lys-Пер, имеющие положительный экстремум в области 220 нм и отрицательную полосу с  $\lambda_{\max}$  232 нм. Для октапептида Trp-Пер характерен спектр КД с одним положительным экстремумом ( $\lambda_{\max}$  225 нм). Такие изменения спектра триптофанового аналога скорее всего связаны с большим вкладом ароматической боковой цепи и, по-видимому, не отражают изменения конформации пептидного остова молекулы. Для глицинового аналога характерен третий вид спектра КД, который имеет отрицательный экстремум при  $\lambda$  230 нм и плечо при  $\lambda$  220 нм.

Хорошо известно, что конформационное состояние молекул, особенно таких лабильных, как молекулы низкомолекулярных пептидов, существенно зависит от природы растворителя. Поэтому нами было проведено исследование спектрополяриметрического поведения всех шести молекул пептидов-аналогов в трифторэтаноле, часто рассматриваемом как одна из возможных моделей среды рецептора [5]. Хотя молекулы пептидов претерпевают конформационные изменения, что отражается в изменении характера КД-спектров (рис. 3), однако по-прежнему все биологически активные аналоги имеют сходный вид спектров. В них можно отметить плечо при  $\lambda$  210 нм и отрицательный экстремум при  $\lambda$  223 нм, что позволяет предположить наличие  $\beta$ -поворота в их структуре [6]. В спектре КД триптофанового аналога появляется отрицательный экстремум, а глициновый аналог имеет спектр КД без характерных особенностей.

Результаты тестирования биологической активности пептидов-аналогов фрагмента 285—292 IgG человека представлены в табл. 4. Интересно, что пептид Lys-Пер обладал активностью, почти в 1,4 раза превышающей активность природного фрагмента His-Пер, а пептид Glu-Пер почти в 1,6 раза более активен. Вполне вероятно, что более высокий уровень активности пептида Lys-Пер связан с тем, что структура BRRBRR представлена практически во всех конформерах, входящих в зазор  $\Delta E \leq 4$  ккал/моль. Высокая активность пептида Glu-Пер может

Расстояния между заряженными группами (Å) для исследованных октапептидов

Заряженные группы	His-Pep*	Lys-Pep**	Arg-Pep*	Glu-Pep*	Trp-Pep*	Gly-Pep*
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> осн. цепи...ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>4</sup>	13,97	13,67	13,46	7,92	13,74	15,58
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> осн. цепи...ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>6</sup>	7,79	6,64	7,41	7,93	6,15	5,79
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> осн. цепи...гуан. гр. Arg <sup>8</sup>	9,84	10,56	10,18	8,36	8,81	8,76
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> осн. цепи...COO <sup>-</sup> осн. цепи	4,64	3,79	4,96	6,78	3,30	3,64
ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>4</sup> ...ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -Lys <sup>6</sup>	17,09	16,04	15,95	12,59	16,15	17,61
ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>4</sup> ...гуан. гр. Arg <sup>8</sup>	20,25	20,98	21,63	13,01	18,63	18,94
ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>4</sup> ...COO <sup>-</sup> осн. цепи	15,88	15,49	7,09	11,86	6,27	16,50
ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>6</sup> ...гуан. гр. Arg <sup>8</sup>	9,38	10,73	9,78	9,53	8,58	9,20
ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>6</sup> ...COO <sup>-</sup> осн. цепи	3,70	3,71	3,71	3,27	3,94	3,83
Гуан. гр. Arg <sup>8</sup> ...COO <sup>-</sup> осн. цепи	7,30	8,37	7,09	6,27	6,27	6,28
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> осн. цепи...ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>1</sup>	—	7,39	—	—	—	—
ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>1</sup> ...ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>4</sup>	—	8,21	—	—	—	—
ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>1</sup> ...ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>6</sup>	—	12,03	—	—	—	—
ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>1</sup> ...гуан. гр. Arg <sup>8</sup>	—	14,97	—	—	—	—
ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>1</sup> ...COO <sup>-</sup> осн. цепи	—	9,76	—	—	—	—
Имидазол His <sup>1</sup> ...NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> осн. цепи	4,67	—	—	—	—	—
Имидазол His <sup>1</sup> ...ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>4</sup>	11,98	—	—	—	—	—
Имидазол His <sup>1</sup> ...ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>6</sup>	10,76	—	—	—	—	—
Имидазол His <sup>1</sup> ...гуан. гр. Arg <sup>8</sup>	8,56	—	—	—	—	—
Имидазол His <sup>1</sup> ...COO <sup>-</sup> осн. цепи	7,43	—	—	—	—	—
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> осн. цепи...гуан. гр. Arg <sup>1</sup>	—	—	7,94	—	—	—
Гуан. гр. Arg <sup>1</sup> ...ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>4</sup>	—	—	8,86	—	—	—
Гуан. гр. Arg <sup>1</sup> ...ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>6</sup>	—	—	11,26	—	—	—
Гуан. гр. Arg <sup>1</sup> ...гуан. гр. Arg <sup>8</sup>	—	—	13,56	—	—	—
Гуан. гр. Arg <sup>1</sup> ...COO <sup>-</sup> осн. цепи	—	—	9,44	—	—	—
γ-COO <sup>-</sup> Glu <sup>1</sup> ...NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> осн. цепи	—	—	—	4,97	—	—
γ-COO <sup>-</sup> Glu <sup>1</sup> ...ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>4</sup>	—	—	—	3,13	—	—
γ-COO <sup>-</sup> Glu <sup>1</sup> ...ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Lys <sup>6</sup>	—	—	—	9,82	—	—
γ-COO <sup>-</sup> Glu <sup>1</sup> ...гуан. гр. Arg <sup>8</sup>	—	—	—	10,40	—	—
γ-COO <sup>-</sup> Glu <sup>1</sup> ...COO <sup>-</sup> осн. цепи	—	—	—	8,93	—	—

\* Конформация № 1 (см. табл. 1).

\*\* Конформация № 2 (см. табл. 1).

объясняться дополнительной стабилизацией пространственной структуры участка, связывающегося с рецептором, за счет электростатических взаимодействий между остатками Lys<sup>4</sup> и Glu<sup>1</sup> (см. табл. 2). Хотя, согласно расчетам, пептид Trp-Pep и имеет структуру участка 3—8, рассматриваемую нами как биологически активную, это соединение было практически неактивным по сравнению с природной последовательностью (His-Pep). Подобное снижение активности, по-видимому, может объясняться наличием индольного кольца у остатка триптофана, создающем стерические препятствия связыванию пептидной цепи аналога с рецептором.

Поскольку участок 5—8 аминокислотной последовательности исследуемых пептидов совпадает с аминокислотной последовательностью тафцина, который также активен в тесте ингибирования комплемента (см. табл. 4), представляло определенный интерес сопоставить пространственную структуру этого участка в пептиде His-Pep и его аналогах с конформационным строением тафцина. Тео-

ретический конформационный анализ молекулы тафцина был проведен исходя из стартовых конформаций работы [7] в приближении фиксированных длин связей и валентных углов, использованном в настоящей работе (см. «Экспериментальную часть»). Сопоставление наборов низкоэнергетических структур фрагмента 5—8 пептида His-Пер и его аналогов и тафцина позволило установить, что конформация участка 5—8 всех октапептидов, причем даже не обладающих биологической активностью, подобна конформации 2 тафцина с  $\Delta E = 0,5$  ккал/моль (табл. 3). Чем же объясняется отсутствие активности у октапептидов Gly-Пер и Trp-Пер?

Существует модель, согласно которой процесс взаимодействия пептидного гормона с рецептором является двухстадийным: на первом этапе происходит узнавание и первичное связывание с рецептором, а на втором — генерирование вторичного сигнала [8]. Хотя указанное предположение в достаточной мере условно, тем не менее в ряде случаев удается выделить структуры, отвечающие за каждый из этапов. Вполне вероятно, что в случае изучаемых нами пептидов N-концевой фрагмент играет ключевую роль в процессе распознавания этих соединений специфическими рецепторами, а карбоксильный фрагмент, соответствующий по последовательности тафцину, ответствен за генерирование вторичного сигнала. Природный октапептид His-Пер и его биологически активные аналоги имеют сходную пространственную структуру N-концевого фрагмента, которая может служить сайтом узнавания и первичного связывания пептида рецептором. Потеря активности у глицинового аналога, возможно, связана с отсутствием взаимодействия пептида с рецептором из-за несоответствия пространственной структуры его N-концевого участка структуре рецептора. Связывание пептида Trp-Пер с рецептором невозможно, по-видимому, вследствие стерических трудностей из-за наличия объемного бокового радикала триптофана. В то же время малые размеры тафцина позволяют непосредственно взаимодействовать с участком генерирования вторичного сигнала, что и обуславливает наличие активности у этого соединения.

Отметим в заключение, что в рамках выделенной выше структуры остова наиболее близкие конформации боковых цепей имеют природный октапептид His-Пер и его лизиновый аналог Lys-Пер, что видно из анализа расстояний между различными заряженными группами (табл. 5). Оба пептида имеют конформации, характеризующиеся удаленностью  $\epsilon$ -аминогруппы остатка Lys<sup>4</sup> и гуанидиновой группы остатка Arg<sup>8</sup> от  $\alpha$ -аминогруппы остатка 1, сближенностью N- и C-концов, а также  $\epsilon$ -аминогруппы остатка Lys<sup>6</sup> с C-концевой карбоксильной группой молекулы. Кроме того,  $\epsilon$ -аминогруппа остатка Lys<sup>4</sup> удалена от гуанидиновой группы остатка Arg<sup>8</sup> и  $\epsilon$ -аминогруппы остатка Lys<sup>6</sup> (табл. 5, рис. 1).

Таким образом, сопоставление результатов расчета и биологической активности октапептида His-Пер и его аналогов позволяет выделить вероятную «биологически активную» конформацию основной цепи BRRBRR на участке Ala<sup>3</sup>-Lys<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>-Lys<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup> фрагмента 285—292 IgG. Результаты проведенного конформационного анализа свидетельствуют о том, что структура молекулы октапептида, выделенная нами как «биологически активная» конформация, практически не зависит от заряда боковой цепи N-концевого аминокислотного остатка. Боковая цепь остатка 1, по-видимому, стабилизирует  $\beta$ -изгиб 3—6 путем плотной упаковки молекулы за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий этой боковой цепи с остовом 2—4.

### Экспериментальная часть

Расчет конформационной энергии пептидов в приближении фиксированных длин связей и валентных углов проводили на ЭВМ IBM AT, используя пакет программ, разработанный в ИОС Латвийской АН, на основе стандартной геометрии пептидов и потенциальных функций программы ЕСЕРР/2 [9, 10]. Процесс минимизации энергии проводился по методу градиентного спуска в пространстве



углов внутреннего вращения  $\varphi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  и  $\chi$  [11]. Величины производных по углам вращения определялись аналитическим путем. Пирролидиновое кольцо пролина фиксировалось в конформации «down» [9]. Ионогенные группы боковых цепей, а также N- и C-концевые группировки основной цепи считались заряженными. Электростатические взаимодействия рассчитывались при значении диэлектрической постоянной  $\epsilon = 4$ , выбранном из соображения адекватного описания ситуации, возникающей при образовании лиганд-рецепторного комплекса [12].

Химический синтез пептидов проводили твердофазным методом, используя ранее описанную методику [2]. Все соединения имели чистоту не ниже 98% по данным ВЭЖХ.

Тестирование биологической активности полученных соединений проводилось по методике, описанной в работе [13].

Спектры КД измеряли при комнатной температуре на дихрографе Mark III в области длин волн 205—250 нм в кювете с длиной оптического пути 0,1 мм. Данные пересчитывали в единицы молярной эллиптичности.

Авторы выражают глубокую признательность М. Д. Шендеровичу за помощь в освоении программ расчета и обсуждении результатов эксперимента.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lukas T. J., Munoz H., Erickson B. W. // *J. Immunol.* 1981. V. 127. № 6. P. 2555—2560.
2. Kaurov O. A., Kolodkin N. I., Kazakov G. P., Halaypin B. D. // *Chemistry of Peptides and Proteins/Eds Voelter W., Bayer E., Ovchinnikov Y. A., Ivanov V. T.* Berlin — New York: Walter de Gruyter, 1986. V. 3. P. 63—71.
3. Попов Е. М. Структурная организация белков. М.: Наука, 1989. С. 113—142.
4. Lewis P. N., Momany F. A., Scheraga H. A. // *Biochim. et biophys. acta.* 1973. V. 303. № 2. P. 211—229.
5. Bakir M., Stevens E. S. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1982. V. 19. № 2. P. 133—139.
6. Rose G. D., Gierasch L. M., Smith J. A. // *Advances in Protein Chemistry/Eds Anfinsen C. B., Edsall J. T., Richards F. M.* New York — London — Tokyo: Acad. Press, 1985. V. 37. P. 1—109.
7. Никифорович Г. В. // *Биоорганическая химия.* 1978. Т. 4. № 11. С. 1427—1430.
8. Чипенс Г. И., Полевая Л. К., Веретенникова Н. И., Крикис А. Ю. Структура и функции низкомолекулярных пептидов. Рига: Зинатне, 1980. С. 50.
9. Momany F. A., McGuire R. F., Burgess A. W., Scheraga H. A. // *J. Phys. Chem.* 1975. V. 79. № 22. P. 2361—2381.
10. Nemethy G., Pottle M. C., Scheraga H. A. // *J. Phys. Chem.* 1983. V. 87. № 11. P. 1883—1887.
11. IUPAC — IUB Commission on Biochemical Nomenclature // *Pure Appl. Chem.* 1974. V. 40. № 3. P. 291—308.
12. Никифорович Г. В. Конформации и функции биологических молекул. Рига: Зинатне, 1984. С. 7—16.
13. Штельцер А. // *Иммунологические методы/Ред. Фримель Г. М.: Медицина, 1987. С. 193—205.*

Поступила в редакцию  
16.VI.1993

После доработки  
29.IX.1993

A. A. Kolobov, N. I. Kolodkin, L. V. Olennikova,  
A. M. Ischenko, O. A. Kaurov

**CONFORMATIONAL ANALYSIS AND HEMOLYTIC ACTIVITY OF THE  
285—292 IMMUNOGLOBULIN G FRAGMENT AND ITS ANALOGUES**

*Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St.-Petersburg*

Theoretical conformational analysis was carried out for the 285—292 fragment of human immunoglobulin G (His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg) and its analogues containing Arg, Glu, Gly, Lys, or Trp residue instead of the His residue in position 1. Spectropolarimetric investigation of these peptides showed the analogues to have different activities in the C1q-mediated erythrocytes hemolysis assay. Comparison of the low-energy structures sets of the compounds tested allowed to suggest a model of the «biological active» conformation for the peptide molecule in the course of the C1q complement component binding.