



УДК 577.1

КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ RGD-СОДЕРЖАЩИХ ЦИКЛОПЕНТАПЕПТИДОВ

© 2000 г. П. В. Костецкий[#], И. В. АртемьевИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 19.03.99 г. Принята к печати 16.11.99 г.

Выполнен теоретический конформационный анализ биологически активного RGD-содержащего пентапептида *cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-DVal-)*, являющегося ингибитором взаимодействия ламинина P1 с его рецептором. Методом Монте-Карло изучено пространство допустимых торсионных углов основной цепи молекулы. Из большого числа предсказанных низкоэнергетических конформеров с различной укладкой циклической части пентапептида отобраны те, которым отвечают стабильные конформеры линейного трипептида Ac-Ala-Gly-Asp-NHMe. Данный пептид моделировал пространственные возможности главной цепи RGD-содержащих фрагментов ламинина, витронектина и фибронектина. Среди нескольких десятков отобранных структур, являющихся потенциально биологически активными конформерами, только небольшое их число способно образовывать стабильные внутримолекулярные водородные связи. Предположили, что биологически активный конформер *cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-DVal-)* может присутствовать в заметных количествах в равновесной смеси в растворе одновременно с другими конформерами, но не обязательно доминировать среди них.

Ключевые слова: циклопептиды; теоретический конформационный анализ; RGD-пептиды.

ВВЕДЕНИЕ

Интегрины представляют собой большое семейство клеточных рецепторов, специфических для белковых лигандов, и играют важную роль в процессах адгезии клеток [1]. Многие из этих рецепторов взаимодействуют с рядом таких белков, как фибронектин, ламинин, витронектин и др., которые содержат трипептидный фрагмент Arg-Gly-Asp (RGD) [1–4]. Однако прочность связывания лигандов этого типа с индивидуальными RGD-зависимыми интегринными заметно различается, несмотря на общий узнающий мотив [5, 6]. Было высказано предположение, что устойчивость интегрин-лигандных комплексов чувствительна к конформации RGD-сайта лиганда и его ближайшего окружения [7, 8].

Для определения пространственных характеристик сайта связывания были получены разнообразные биологически активные циклические RGD-пептиды, являющиеся ингибиторами адгезии клеток [9–11]. Некоторые из этих пептидов с ограниченной конформационной подвижностью обладают одинаковым или более высоким сродством к рецептору, чем линейные RGD-пептиды. Методами двухмерной ЯМР-спектроскопии и молекулярной динамики была определена конформация основной цепи шести циклопентапептидов, содержащих RGD-последовательность [7, 10, 11]. Во всех пептидах к трипептидному кору был добавлен ос-

таток фенилаланина для улучшения гидрофобного связывания с рецептором, а пятый аминокислотный остаток выполнял чисто структурную “спейсерную” роль, так что пентапептидная последовательность имела вид Arg-Gly-Asp-Phe-Xaa, где Xaa = Ala или Gly. При этом один из остатков указанной пептидной последовательности имел D-конфигурацию, что обеспечивало образование в получаемой циклической пространственной структуре двух изгибов β_{II} - и γ -типа [10, 12].

Оказалось, что два из шести изученных циклопентапептидов, а именно *cyclo(-Arg-Gly-Asp-DPhe-Val-)* и *cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-DVal-)* обладали почти в 100 раз более высокой антиадгезионной активностью, чем синтетический линейный пептидный фрагмент фибронектина Gly-Arg-Gly-Asp-Ser [8]. Циклопептид с остатком DVal обладал селективной ингибирующей активностью в отношении рецептора ламинина P1, а циклопептид с остатком DPhe взаимодействовал также и с рецептором витронектина. Для каждого из этих циклопептидов на основе спектральных данных была предложена единственная конформация с двумя внутримолекулярными водородными связями [10], однако значения двугранных углов, отвечающих этим конформациям, не были приведены.

Показано, что циклопентапептиды не являются в растворе абсолютно жесткими молекулами, а обладают заметной конформационной подвижностью [11, 13]. Так, только часть структуры *cyclo(-DPro-Ala-Ala-Ala-Ala-)*, включая остаток

[#] Автор для переписки (e-mail: pkos@ibch.siohc.ras.ru).

DPro, находится в устойчивой конформации β_1 -изгиба, а остальная часть молекулы более подвижна и для нее возможны конформации с вращением одной амидной связи [13]. В пептидах подобный конформационный переход с согласованным изменением ориентации протонов относительно плоскости β -изгиба наблюдался и другими авторами [12, 14–19].

Известно, что циклизация пептидов приводит иногда к образованию пространственных структур, не наблюдаемых для их линейных аналогов [13]. Кроме того, конформация пептида в растворе может и не совпадать с его активной конформацией, принимаемой при связывании с молекулой рецептора. Естественно предположить также, что чем больше низкоэнергетических конформеров данного пептида может существовать в растворе, тем меньше вероятность того, что биологически активным является доминирующий в растворе конформер. В связи с этим обстоятельством полезно уметь заранее предсказывать большинство возможных низкоэнергетических конформеров биологически активных циклических аналогов пептидов.

Недавно нами с помощью теоретического конформационного анализа были исследованы пространственные возможности дипептидного фраг-

мента $\overbrace{\text{-Lys-Asp}}$ – биологически активного циклического аналога пентапептида тимопентина

$\overbrace{\text{Arg-Lys-Asp-Val-Tyr}}$ [20]. Было показано, что из 42 низкоэнергетических конформеров только 32 соответствовали также и низкоэнергетическим областям дипептидного фрагмента *Lys-Asp*. Тем самым, оказалось возможным существенно ограничить область конформационного пространства, содержащую биологически активную конформацию минимального дипептидного фрагмента тимопентина. При этом для циклического

дипептида $\overbrace{\text{Ac-Lys-Asp-NHMe}}$ удалось определить положение разрешенных областей на ϕ, ψ -картах остатков *Lys* и *Asp*.

В настоящей работе выполнен теоретический конформационный анализ биологически активного RGD-содержащего циклопентапептида *cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-DVal-)* (I), являющегося ингибитором взаимодействия белка ламинина P1 из семейства интегринов с его рецептором [10]. С помощью метода Монте-Карло было изучено пространство допустимых торсионных углов основной цепи молекулы (I). Из большого числа предсказанных низкоэнергетических конформеров с различной укладкой основной цепи пентапептида (I) были отобраны те, которым отвечают стабильные конформеры линейного трипептида *Ac-Ala-Gly-Asp-NHMe* (II). Данный пептид моделировал пространственные возможности основной цепи RGD-содержащих фрагментов ламини-

на, витронектина и фибронектина. При этом минимальный трипептид (II) выполнял роль своеобразного энергетического “шаблона”, а отобранные с его помощью конформеры циклопентапептида (I) можно отнести к потенциально биологически активным. Среди нескольких десятков отобранных потенциально биологически активных конформеров только небольшое их число способно образовывать внутримолекулярные водородные связи.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Расчетным путем нами был получен 301 низкоэнергетический конформер ($\Delta E < 5.0$ ккал/моль) пептида *cyclo(-Ala-Gly-Asp-Ala-DVal-)* (III), пространственные возможности основной цепи которого охватывают все вероятные формы изучаемого RGD-циклопептида (I). Оказалось при этом, что в большинстве найденных структур один или более из остатков *Ala-Gly-Asp*-фрагмента попадают в энергетически невыгодные области конформационной ϕ, ψ -карты аминокислотных остатков линейных пептидов [21].

Для указания различных участков конформационной ϕ, ψ -карты Циммерманом и Шерагой были предложены [21] символьные обозначения, используемые в работах по исследованию пространственного строения пептидов [22, 23]. При этом вся площадь ϕ, ψ -карты разбита на 16 областей, для каждой из которых фиксированы соответствующие обозначения. Символы A, C, D, E, F, G и A* отвечают областям, где наиболее часто встречаются все аминокислотные остатки белков с установленной пространственной структурой. Символы B, B*, C*, D*, E*, F*, G* отвечают областям, доступным только остаткам *Gly*. Области, в которые почти не попадают аминокислотные остатки белков, обозначены символами H и H*. В настоящей работе для указания местоположения аминокислотных остатков изучаемых пептидов на конформационной ϕ, ψ -карте также используются символы Циммермана–Шераги, которые далее называются конформационными кодами. Так, например, из табл. 1 можно видеть, что в некоторых расчетных конформерах *cyclo(-Ala-Gly-Asp-Ala-DVal-)* (III) остатки *Ala* и *Asp* попадают в невыгодные области ϕ, ψ -карты, обозначаемые символами C*, G*, H и H*.

Естественно предположить, что биологически активным конформерам циклопентапептида (III) отвечают те, в которых модельный *Ala-Gly-Asp*-фрагмент сохраняет низкоэнергетическую конформацию основной цепи. Поэтому среди низкоэнергетических конформеров циклопентапептида (III) следовало найти такие, стереохимия основной цепи которых соответствует предпочтительным конформерам модельного линейного трипептида (II).

Таблица 1. Конформационные коды^a Ala-Gly-Asp-фрагмента и биологическая активность (БА) конформеров cyclo(-Ala-Gly-Asp-Ala-DVal-) (III) с энергией $\Delta E < 5.0$ ккал/моль

Номер конформера	ΔE , ккал/моль	Код фрагмента	БА ^b	Номер конформера	ΔE , ккал/моль	Код фрагмента	БА ^b
1	0.0	CC*A	+	27	1.8	AHC	
2	0.9	CC*A	+	28	1.8	DB*G	
3	0.9	CA*C*	+	29	1.9	AAA	
4	0.9	CC*C	+	30	1.9	A*D*A	
5	0.9	ACC*		31	1.9	GAG	
6	1.1	ANA		32	2.0	CC*C	
7	1.1	CC*G	+	33	2.0	GAA	
8	1.2	DC*G	+	34	2.0	CC*F	+
9	1.3	AAG	+	35	2.0	CA*H	+
10	1.3	DC*A	+	36	2.1	CC*A	+
11	1.3	H*C*F	+	37	2.1	HAF	
12	1.4	CA*C*	+	38	2.1	DD*A	
13	1.4	DC*A	+	39	2.1	GGA	
14	1.5	AGA		40	2.1	CC*F	+
15	1.5	DB*G		
16	1.6	DC*F		292	4.9	CC*G	+
17	1.6	ANA		293	4.9	C*AD	
18	1.6	FC*G	+	294	4.9	GAF	
19	1.6	ACC*		295	4.9	A*C*C	+
20	1.7	GAG		296	5.0	CA*H*	
21	1.7	ANA		297	5.0	G*A*A*	
22	1.7	DA*G		298	5.0	AHC	
23	1.7	AHC		299	5.0	A*D*A*	
24	1.8	AAG		300	5.0	DA*G	+
25	1.8	DB*G		301	5.0	B*GC	
26	1.8	CC*A					

^a Конформационные коды отвечают областям конформационной ϕ, ψ -карты согласно номенклатуре Циммермана–Шераги [21].

^b Знаком “+” помечены потенциально биологически активные конформеры, соответствующие низкоэнергетическим конформерам ($\Delta E < 3.0$ ккал/моль) модельного линейного пептида Ac-Ala-Gly-Asp-NHMe.

Мы вычислили потенциальную энергию конформеров линейного трипептида Ac-Ala-Gly-Asp-NHMe (II), имеющих те же значения двугранных углов основной цепи (Φ_{Ala} , Ψ_{Ala} , $\omega_{Ala-Gly}$, Φ_{Gly} , Ψ_{Gly} , $\omega_{Gly-Asp}$, Φ_{Asp} , Ψ_{Asp}), что и у полученных 301 низкоэнергетического конформера циклопентапептида (III) (табл. 1). Вычисленную потенциальную энергию конформеров сравнивали с потенциальной энергией самого выгодного конформера, поиск которого в связи с простым строением молекулы трипептида (II) не представлял большой сложности (см. “Эксперимент. часть”). Оказалось, что у 254 конформеров потенциальная энергия Ala-Gly-Asp-фрагмента существенно выше ($\Delta E > 3.0$ ккал/моль), чем у самого выгодного конформера модельного линейного трипептида (II). Среди оставшихся 47 потенциально биологически активных конформеров циклопентапептида (III) большинство не содержат аминокислотные остатки Ala-Gly-Asp-фрагмента в неблагоприятных энергетических областях (табл. 2). При этом ни для одного из них значения торсионных

углов каждого из остатков Ala, Gly или Asp не выходят за рамки низкоэнергетических областей более чем на 9–10°.

В отобранных 47 конформерах циклопентапептида (III) пространственная укладка Ala-Gly-Asp-фрагмента отвечает очень небольшой части (~10%) низкоэнергетических конформеров шаблонного линейного трипептида (II). Таким образом, в результате сравнения низкоэнергетических структур циклопентапептида (III) и линейного трипептида (II) удалось выделить ограниченную область конформационного пространства, содержащую биологически активную конформацию Ala-Gly-Asp-фрагмента.

Следует отметить, что теоретически при циклизации RGD-содержащего пептида большинство из возможных низкоэнергетических конформеров не должны сохранять биологическую активность. Действительно, из найденных нами 301 низкоэнергетического конформера пептида (III), часть которых представлена в табл. 1, более 80% заведомо не могут быть биологически актив-

Таблица 2. Конформационные коды^a 47 низкоэнергетических конформеров ($\Delta E < 5.0$ ккал/моль) *cyclo(-Ala-Gly-Asp-Ala-DVal-)* (III), у которых укладка *Ala-Gly-Asp*-фрагмента соответствует выгодным конформерам ($\Delta E < 3.0$ ккал/моль) линейного модельного трипептида *Ac-Ala-Gly-Asp-NHMe* (II)

Номер конформера	ΔE , ккал/моль	Код фрагмента	Номер конформера	ΔE , ккал/моль	Код фрагмента
1	0.0	CC*ACC*	25	2.7	CC*EA*F*
2	0.9	CC*ADC*	26	2.7	A*A*DA*G*
3	0.9	CA*C*CC*	27	2.8	CC*FC*H
4	0.9	CC*CA*D*	28	2.8	AAEA*E*
5	1.1	CC*GCC*	29	2.9	ABGGA
6	1.2	DC*GCA*	30	3.1	A*C*HCH*
7	1.3	AAGCC*	31	3.2	FC*ANA
8	1.3	DC*ADA*	32	3.4	DA*DA*D*
9	1.3	H*C*FCG*	33	3.6	HVDC*A
10	1.4	CA*C*CC*	34	3.8	GBGGA
11	1.4	DC*ADA*	35	3.9	CA*C*CC*
12	1.6	FC*GCC*	36	3.9	A*B*DA*G*
13	2.0	CC*FAH	37	4.0	CA*GDD*
14	2.0	CA*HCE*	38	4.0	C*AFCG*
15	2.1	CC*ADC*	39	4.1	A*C*ADH*
16	2.1	CC*FCE*	40	4.5	C*ACC*C
17	2.2	A*C*CA*G*	41	4.8	C*BDC*C
18	2.2	DA*GGA	42	4.9	A*A*GDF*
19	2.3	HCGGA	43	4.9	CA*A*DC*
20	2.4	CA*DA*D*	44	4.9	GBGGA
21	2.4	H*C*FCG*	45	4.9	CC*GBD*
22	2.5	H*C*AGC	46	4.9	A*C*CA*H*
23	2.6	CA*DA*D*	47	5.0	DA*GGA
24	2.6	CC*BDC*			

^a Конформационные коды отвечают областям конформационной ϕ, ψ -карты согласно номенклатуре Циммермана-Цераги [21].

ними. Трудно поэтому рассчитывать, что циклический биологически активный конформер будет доминировать в растворе.

Интересно, что при конформационном анализе близкого по строению основной цепи пентапептида *cyclo(-Leu-DTrp-DAsp-Pro-DVal-)* с помощью того же метода было найдено только 36 низкоэнергетических конформеров с различной укладкой основной цепи [19]. Найденное нами число низкоэнергетических конформеров циклопентапептида (II) почти в 10 раз выше. Это можно объяснить тем, что в нашем случае вместо остатка Pro, для которого область разрешенных значений торсионных углов ϕ и ψ во много раз меньше, присутствует остаток Gly с большой конформационной свободой. Кроме того, в нашем случае два остатка Ala имеют гораздо более простую боковую цепь, чем остатки Leu и DTrp, и это значительно облегчало анализ конформационного пространства, доступного для основной цепи исследуемого нами пептида (III).

Пентапептид cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-DVal-). Для каждого из 47 низкоэнергетических конформеров циклопептида (III) (табл. 2) конструировали наборы по 30 конформеров циклопентапепти-

да (I) с геометрией основной пептидной цепи, близкой исходной, и случайным расположением боковых цепей (см. "Эксперимент. часть"). По результатам минимизации потенциальной энергии отбирали наилучший вариант расположения боковых цепей аминокислотных остатков из всех 30 конформеров набора. Нашли, что для сорока одной из 47 низкоэнергетических структур циклопентапептида (III) можно получить хотя бы одну, соответствующую низкоэнергетическому конформеру циклопентапептида (I) (табл. 3).

Следует, конечно, иметь в виду, что лучший из представленных в табл. 3 конформер циклопентапептида (I) вряд ли отвечает глобальному минимуму. Поиск соответствующего конформера представляет самостоятельную и непростую задачу, так как число переменных, определяющих ориентацию боковых цепей остатков Arg, Asp, Phe и Val, велико. В нашем случае такой поиск не обязателен, так как задача настоящей работы – изучение пространственных возможностей и предсказание биологически активных конформаций основной цепи RGD-фрагмента циклопентапептида (I), но не определение точной ориентации его боковых цепей. Тем не менее интересно,

Таблица 3. Характеристики 41 низкоэнергетического ($\Delta E < 5.0$ ккал/моль) конформера cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-DVal-) (I), у которых укладка RGD-фрагмента соответствует выгодным конформерам модельного линейного пептида Ac-Ala-Gly-Asp-NHMe^a

Номер конформера	ΔE , ккал/моль	Код фрагмента ^b	Двугранные углы, градусы							
			Arg		ω	Gly		ω	Asp	
			φ	ψ		φ	ψ		φ	ψ
1	0.0	CC*A	-61	109	-173	68	-112	178	-73	-60
2	0.1	CA*C*	-72	109	-177	81	79	-176	66	-82
3	0.4	GBG	-125	-74	-173	-100	38	-177	-171	-56
4	0.5	CA*C*	-72	111	-177	75	79	-177	68	-78
5	1.1	HCG	-89	-124	-177	-89	55	-179	-166	-51
6	1.2	DA*G	147	106	178	77	33	177	-175	-52
7	1.4	CC*F	-82	106	-176	90	-56	174	-78	-141
8	1.4	H*C*F	70	97	-176	85	-68	169	-77	-155
9	1.7	CA*C*	-71	111	178	74	61	-179	77	-56
10	1.7	CC*G	-65	117	-177	81	-83	179	-124	-51
11	1.8	A*C*C	53	58	-170	85	-105	-177	-75	108
12	2.0	CC*C	-67	97	-173	71	-106	179	-74	110
13	2.0	H*C*A	71	102	176	93	-85	179	-64	-53
14	2.3	A*A*G	61	36	177	72	43	172	-165	-64
15	2.4	H*C*F	74	100	-173	89	-67	169	-80	-153
16	2.4	CC*F	-84	95	-177	88	-57	174	-77	-147
17	2.4	CA*D	-92	63	-174	68	36	-175	-170	53
18	2.4	CC*A	-92	63	-174	84	-82	-176	-67	-42
19	2.5	DC*A	157	56	-170	85	-68	-179	-71	-65
20	2.5	CA*G	-97	68	178	65	20	-179	-145	-68
21	2.6	CA*E	-79	96	-178	75	29	178	-164	-141
22	2.7	CC*B	-66	118	-176	73	-106	176	-117	19
23	2.8	CC*F	-71	121	-172	69	-112	174	-73	134
24	2.8	DA*G	149	102	-178	84	25	177	-168	-59
25	2.9	A*A*D	73	54	176	76	26	176	-163	49
26	3.1	CC*E	-58	115	-174	79	-84	175	-129	141
27	3.1	A*C*C	63	63	177	89	-60	-177	-85	56
28	3.2	GBG	-148	-72	-176	-105	39	-175	-172	-51
29	3.4	A*C*H	57	52	-177	93	-60	178	-79	-130
30	3.5	FC*G	-72	140	-178	89	-76	174	-137	-70
31	3.6	A*C*A	55	55	-178	91	-76	-169	-70	-76
32	3.6	A*B*D	71	76	174	87	-8	-176	-154	56
33	3.7	ADG	-78	-83	-177	-132	56	179	-167	-53
34	3.7	AAE	-64	-69	177	-80	-65	175	-138	138
35	3.9	HBD	-94	-109	171	-92	49	-169	-173	43
36	3.9	FC*A	-78	134	179	73	-110	-177	-71	-64
37	4.0	CC*A	-83	62	-177	82	-80	-178	-60	-49
38	4.1	CA*D	-94	69	-179	68	20	179	-164	64
39	4.3	AAG	-66	-70	-175	-83	-67	175	-122	-55
40	4.9	C*AH	84	-75	178	-79	-62	174	-83	-136
41	5.0	C*AC	66	-98	-179	-77	-75	177	-80	83

^a Отсчет торсионных углов производится в соответствии с принятой номенклатурой [24].

^b Конформационные коды отвечают областям конформационной φ, ψ -карты согласно номенклатуре Циммермана-Шераги [21].

Таблица 4. Геометрия водородных связей γ - и β -изгибов потенциально биологически активных низкоэнергетических конформеров *cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-DVal-)* (I)

ΔE , ккал/моль	N ^a	Тип изгиба	Остаток		Угол ННО, градусы	Расстояние Н...О, Å
			НН-группа	СО-группа		
1.1	5	γ	Asp	Arg	145.3	2.22
1.4	7	γ	Asp	Arg	143.5	2.32
1.7	9	γ	Phe	Gly	147.0	2.04
2.4	15	γ	DVal	Asp	140.9	2.12
2.4	16	γ	Asp	Arg	145.2	2.24
2.4	17	γ	Gly	DVal	141.1	2.34
2.4	18	γ	Arg	Phe	141.5	2.38
		γ	Gly	DVal	140.6	2.38
2.7	22	β	Phe	Arg	153.5	2.24
3.1	27	γ	Asp	Arg	144.3	2.26
		γ	Phe	Gly	145.9	2.15
3.9	35	γ	DVal	Asp	144.8	2.08
4.0	37	γ	Arg	Phe	140.9	2.40
		γ	Gly	DVal	143.1	2.17
4.9	40	γ	DVal	Asp	140.3	2.16
4.8	22 ^b	β	Phe	Arg	155.6	2.12
		γ	Arg	Phe	134.1	2.09

^a N и ΔE – соответственно номера и величина потенциальной энергии конформеров, приведенных в табл. 3.

^b Конформер, в котором торсионные углы отличаются менее, чем на 5° по сравнению с конформером **22** ($\Delta E = 2.7$ ккал/моль).

что наиболее выгодно по энергии конформеру **1** ($\Delta E = 0.0$ ккал/моль) *cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-DVal-)* (I) (табл. 3) соответствует и самый выгодный по энергии исходный конформер *cyclo(-Ala-Gly-Asp-Phe-DVal-)* (II) (табл. 2) с той же самой укладкой Arg(Ala)-Gly-Asp-фрагмента.

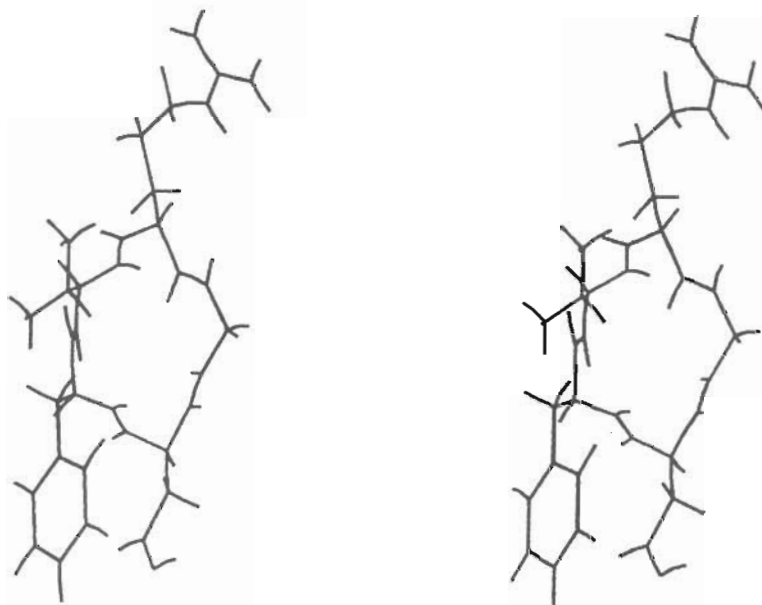
Среди 41 низкоэнергетического потенциально биологически активного конформера циклопентапептида (I) аминокислотные остатки RGD-фрагмента попадают преимущественно в разные участки ϕ, ψ -карт, обозначенных в табл. 3 символическими кодами в соответствии с номенклатурой Циммермана–Шераги [21]. Так, остаток Gly в тридцати одном конформере присутствует в областях С* и А*, тогда как остаток Asp только трижды попадает в область С* (конформеры **2**, **4**, **9**) и ни разу – в область А*. В то же время остаток Arg присутствует в 20 конформерах в областях С и D, в которых только по одному разу встречается остаток Gly. Почти в половине потенциально биологически активных конформеров циклопентапептида (I) остаток Asp находится в областях G и A, где редко встречаются остатки Arg и Gly. Для конформационно свободного в линейных пептидах остатка Gly становятся недоступными области G, F, F* и E.

Нужно отметить также, что в 5 потенциально биологически активных конформерах циклопеп-

тапептида (I) один из остатков Arg или Asp попадает в область С*, где они не встречаются в белковых молекулах [25]. Поэтому представляется маловероятным, чтобы в фибронектине, ламинине, витронектине и других RGD-содержащих белках-мишенях эти остатки оказались бы в указанной области конформационной карты.

Как было найдено рядом исследователей [10, 12, 26, 27], циклические пентапептиды легко принимают в растворе конформацию γ -изгиба. Нами был проанализирован 41 низкоэнергетический потенциально биологически активный конформер циклопентапептида (I), среди которых нашлись 11 конформеров с расположением аминокислотных остатков, близким к γ -изгибу со значением угла N–H...O не менее 140° (табл. 4). Один из них обладал геометрией, наиболее отвечающей водородной связи с углом N–H...O 147° [28, 29] и с расстоянием между атомами Н и О 2.04 Å. Но даже и в этом случае геометрия водородной связи заметно отличается от линейной, и дополнительная энергия, стабилизирующая конформер, не может быть большой. Поэтому возможное присутствие внутримолекулярных водородных связей не является препятствием для конформационных переходов циклопентапептида (I) в растворе.

Следует отметить, что наличие в молекуле циклопентапептида (I) β -изгиба с водородной свя-



Стереизображение низкоэнергетического конформера **1** ($\Delta E = 0.0$ ккал/моль, табл. 3) cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-DVal-).

зью, аналогичной имеющейся, по данным ЯМР, в растворе [10], оказалось возможным только для одного конформера **22** ($\Delta E = 2.7$ ккал/моль) табл. 3. Но для него при этом отсутствует γ -изгиб, установленный экспериментально. Отметим, что и наиболее выгодный по энергии из предсказанных нами потенциально биологически активных конформеров циклопентапептида (I) (табл. 3) не содержит водородных связей (рисунок).

Тем не менее для конформера **22** ($\Delta E = 2.7$ ккал/моль) с водородной связью (табл. 4) при небольшом (до 5°) отклонении значений торсионных углов от равновесных значений оказалось возможным одновременное присутствие двух слабо выраженных водородных связей, которые могут стабилизировать β - и γ -изгибы. Аналогичные структуры возможны, по-видимому, и среди всех низкоэнергетических конформеров (301), полученных нами при циклизации Ala-Gly-Asp-содержащих пептидов, часть из которых представлена в табл. 1. Трудно, однако, согласиться с Х. Кесслером [10], полагающим, что биологическая активность RGD-пептида (I) обуславливается конформером с двумя внутримолекулярными водородными связями, который доминирует в растворе согласно спектральным данным. Ингибирующая активность антиадгезионного циклопентапептида (I) вполне может быть обусловлена наличием в растворе одного из низкоэнергетических минорных конформеров. Такая ситуация скорее всего имеет место и для линейного RGD-пентапептида Gly-Arg-Gly-Asp-Ser, активность которого в 100 раз ниже, чем циклопептида (I).

Действительно, в ряде работ было показано, что циклопентапептиды [13] и циклогексапептиды

[12, 30] способны претерпевать конформационные переходы в растворе, где присутствуют в равновесии сразу несколько конформеров. Как было показано нами, в случае исследованного в настоящей работе cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-DVal-) (I), содержащего RGD-мотив, существует возможность реализации более 300 низкоэнергетических конформеров с различной укладкой основной цепи RGD-фрагмента (табл. 1). Среди этих конформеров около 40 отвечают низкоэнергетической укладке RGD-фрагмента, включая, по-видимому, и биологически активный конформер.

Таким образом, присутствие биологически активной конформации в растворе возможно одновременно наряду с рядом других низкоэнергетических структур. Среди последних могут доминировать и неактивные конформеры с внутримолекулярными водородными связями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конформеры циклических пентапептидов (I) и (III) и линейного трипептида (II) конструировали с помощью программы теоретического конформационного анализа MOBY, использующей силовое поле AMBER [31, 32]. Программа позволяет находить минимумы потенциальной энергии валентных и невалентных взаимодействий молекул, содержащих до 150 атомов. Энергия валентных взаимодействий включает составляющие для отклонений длин связей, величин валентных и торсионных углов от стандартных или наиболее выгодных значений. Энергия невалентных взаимодействий учитывает составляющие для ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий.

вий (ϵ 40), но не включает энергию возможных водородных связей с целью поиска максимально возможного числа конформеров, отвечающих локальному минимуму потенциальной энергии.

Для расчетов использовали персональный компьютер IBM-486 DX 33-МГц. Время поиска локального минимума потенциальной энергии одного конформера наибольшей из исследованных молекул – циклопептида (I) составляло 5 мин. В качестве начального приближения при поиске конформеров пептидов (II) и (III) брали произвольные значения торсионных углов. Длина пептидной связи и величины нескольких валентных углов циклизуемой части циклопептида (III) оказывались при этом далекими от стандартных значений. В процессе минимизации энергии происходило автоматическое устранение стереохимических дефектов в месте циклизации молекулы. В некоторых случаях это происходило нежелательным образом с изменением конфигурации аминокислотных остатков.

Каждую серию конформеров пептида (III) получали из 500 случайных начальных приближений, для которых осуществляли по 30 итераций минимизации потенциальной энергии с последующим отбрасыванием конформеров с энергией более 500 ккал/моль и конформеров, поменявших конфигурацию аминокислотного остатка. Потенциальную энергию оставшихся конформеров минимизировали. Итерации заканчивались при соблюдении условия $\{\Delta E/E\} < 10^{-4}$. Из двух конформеров, двугранные углы которых различались не более чем на 30° , оставляли один с меньшим значением энергии.

В каждой очередной серии минимизированных конформеров подсчитывали число конформеров (N) с заданным уровнем энергии и среди них – количество ранее встречавшихся конформеров ($N1$). При этом два конформера считались неодинаковыми, если они различались хотя бы одним торсионным углом на величину более 30° . Поскольку нас интересовали в основном конформационные возможности RGD-фрагмента, обеспечивающего биологическую активность $\text{cyclo}(-\text{Arg-Gly-Asp-Phe-DVal-})$ (I), сравнение конформеров модельного циклопептида (III) производили только по величинам торсионных углов последовательных остатков Ala, Gly и Asp. Степень полноты выборки суммарного числа различающихся конформеров (p) оценивали соотношением $p = N1/N$ [33]. Для циклического пептида (III) был получен 301 конформер с *транс*-конфигурацией амидных связей основной цепи и с величинами энергии, не превышающими 5.0 ккал/моль по сравнению с самым выгодным конформером. Это соответствовало 95% предполагаемого числа конформаций, различающихся укладкой остатков Ala, Gly и Asp, которые моделируют биологи-

чески активный участок Arg-Gly-Asp в конечном циклопептиде (I).

При поиске конформера линейного трипептида (II) с наименьшей потенциальной энергией исходили из серий по 500 случайных стартовых приближений, как и в случае циклического пептида (III). Сравнивали друг с другом только минимизированные до конечных условий конформеры с энергией (ΔE) в интервале 1.0 ккал/моль. Число серий увеличивали до тех пор, пока наилучший конформер не встретился трижды. При этом степень полноты суммарного набора конформеров (1500 структур), оцениваемая по вышеприведенному соотношению, соответствовала 95% предполагаемого общего числа конформеров с $\Delta E < 1.0$ ккал/моль.

При оценке потенциальной энергии конформеров линейного пептида (II), моделирующего фрагмент пептида (III), расхождение соответствующих торсионных углов Φ_{Ala} , Ψ_{Ala} , Φ_{Gly} , Ψ_{Gly} , Φ_{Asp} , Ψ_{Asp} не превосходило 15° . Различие двугранных углов амидных связей $\omega_{\text{Ala-Gly}}$, $\omega_{\text{Gly-Asp}}$ пептидов (II) и (III) не превышало $1-2^\circ$. Из всех низкоэнергетических конформеров циклопептида (III), числом 301, отобрали 47, которые отвечали энергетически выгодной пространственной укладке ($\Delta E < 3.0$ ккал/моль) трипептидного шаблона (II).

Для получения низкоэнергетических потенциально биологически активных конформеров циклопептида (I) брали каждый из 47 конформеров модельного циклопептида (III) (табл. 1), у которых остатки Ala шаблона (II) заменены на Arg и Phe. При вариации торсионных углов χ_1 , χ_2 остатка Arg, угла χ_1 остатка Asp, углов χ_1 , χ_2 остатка Phe и угла χ_1 остатка DVal с шагом 30° находили по 30 наиболее выгодных по энергии конформеров, потенциальную энергию которых минимизировали обычным образом. Наилучший из 30 минимизированных конформеров отбирали в качестве вероятного биологически активного конформера циклопептида (I) с заданной укладкой основной аминокислотной цепи (табл. 3).

При анализе возможных водородных связей рассматривались конформеры с расстоянием между атомами водорода и кислорода не превосходящим 2.4 Å и углом N-H...O более 140° .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hynes R.O. // Cell. 1992. V. 59. P. 11–25.
2. Abraham D.G., Nutt E.M., Bednar R.A., Bednar B., Gould R.J., Duong L.T. // Molecular Pharmacology. 1997. V. 52. P. 227–236.
3. Mohri H., Tanabe J., Katoh K., Okubo T. // Peptides. 1995. V. 16. P. 263–268.
4. Bowditch R.D., Hariharan M., Tominna E.F., Smith J.B., Yamada K.M., Getzoff E.D., Ginsberg M.H. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 10856–10863.

5. Yamada K.M. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 12809–12812.
6. D'Souza S.E., Ginsberg M.H., Plow E.F. // Trends Biochem. Sci. 1991. V. 16. P. 246–250.
7. Muller G., Gurrath M., Kessler H., Timpl R. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1992. V. 31. P. 326–328.
8. Pfaff M., Tangemann K., Muller B., Gurrath M., Muller G., Kessler H., Timpl R., Engel J. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 20233–20238.
9. Aumailley M., Gurrath M., Mueller G., Calvete J., Timpl R., Kessler H. // FEBS Lett. 1991. V. 291. P. 50–54.
10. Gurrath M., Mueller G., Kessler H., Aumailley M., Timpl R. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 210. P. 911–921.
11. Wermuth J., Goodman S.L., Jonczyk A., Kessler H. // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 1328–1335.
12. Stradley S.J., Rizo J., Bruch M.D., Stroup A.M., Gierasch L.M. // Biopolymers. 1990. V. 29. P. 263–287.
13. Mierke D.F., Kurz M., Kessler H. // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 1042–1049.
14. Kopple K.D., Bhandary K.K., Kartha G., Wang Y., Parameswaran K.N. // J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 4637–4642.
15. Kessler H., Bats J.W., Lautz J., Mueller A. // Liebig's Ann. Chem. 1989. P. 913–928.
16. Kopple K.D., Wang Y., Cheng A.G., Bhandary K.K. // J. Am. Chem. Soc. 1988. V. 110. P. 4168–4176.
17. Kessler H., Matter H., Gemecker G., Kottenhahn M., Bats J.W. // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 4805–4818.
18. Perzel A., Hollosi M., Sandor P., Fasman G.D. // Int. J. Peptide Protein Res. 1993. V. 41. P. 223–236.
19. Seffler A.M., Lauri G., Bartlett P.A. // Int. J. Peptide Protein Res. 1996. V. 48. P. 129–138.
20. Костецкий П.В., Артемьев И.В. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 879–885.
21. Zimmerman S.S., Pottle M.S., Nemethy G., Scheraga H.A. // Macromolecules. 1977. V. 10. P. 1–8.
22. Mammi N.J., Hassan M., Goodman M. // J. Am. Chem. Soc. 1985. V. 107. P. 4008–4013.
23. Roos H.M., Van Rooyen P.H. // Int. J. Peptide Protein Res. 1994. V. 44. P. 562–567.
24. Kendrew J.C., Klyne W., Lifsan S., Miyazawa T., Nemethy G., Phillips D.C., Ramachandran G.N., Scheraga H.A. // Arch. Biochem. Biophys. 1971. V. 145. P. 405–421.
25. Попов Е.М. Структурная организация белков. М.: Наука, 1992. С. 60–81.
26. Reily M.D., Thanabal V., Omecinsky D.O., Dunbar J.B., Jr., Doherty A.M., DePue P.L. // FEBS Lett. 1992. V. 300. P. 136–140.
27. Kessler H., Klein A.G., Obermeier R., Will M. // Liebig's Ann. Chem. 1989. P. 269–294.
28. Nemethy G., Printz M.P. // Macromolecules. 1972. V. 5. P. 755–758.
29. Nemethy G., Scheraga H.A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1980. V. 95. P. 320–327.
30. Prachand M.S., Dhingra M.M., Saran A., Coutinho E., Bodi J., Suli-Vargha H., Medzyhradszky K. // J. Pept. Res. 1998. V. 51. P. 251–265.
31. Weiner S.J., Kollman P.A., Nguyen D.T., Case D.A. // J. Comput. Chem. 1986. V. 7. P. 230–252.
32. Howeler U. Moby. Molecular Modelling on the PC. Berlin; Heidelberg; Tokio: Springer Verlag, 1991.
33. Соболев Т.М. Метод Монте-Карло. М.: Наука, 1968.

A Conformational Analysis of Biologically Active RGD-containing Cyclopentapeptides

P. V. Kostetsky[#] and I. V. Artem'ev

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

The theoretical conformational analysis of the biologically active RGD-containing pentapeptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-DVal-), an inhibitor of laminin P1 interaction with its receptor, was performed. The space of permissible torsional angles of the backbone of the molecule was studied by the Monte Carlo method. From the large number of predicted low-energy conformers with various packings of the cyclic moiety of this pentapeptide, only those were selected that corresponded to stable structures of the model linear tripeptide Ac-Ala-Gly-Asp-NHMe. This peptide simulated the spatial possibilities of the backbones of RGD-containing fragments of laminin, vitronectin, and fibronectin. We selected several dozen structures that may be potential biologically active conformers, but only a few of them were capable of forming stable intramolecular hydrogen bonds. We assumed that a biologically active conformer of cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-DVal-) can be present in significant amounts in an equilibrium mixture in solution along with other conformers without necessarily dominating among them.

Key words: cyclopeptides, theoretical conformational analysis, RGD-peptides

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: pkos@ibch.siobc.ras.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 4. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.