



УДК 577.175.8'17:543.42

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИИ ЭНКЕФАЛИНОВ МЕТОДАМИ  
КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА И ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Стрельцова З. А.

*Всесоюзный кардиологический научный центр  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Методами КД и флуоресценции исследована конформация Leu- и Met-энкефалинов и их 17 синтетических аналогов в водном растворе и диоксане. Полученные результаты позволяют предположить, что большинство исследованных пептидов в диоксане имеет конформацию  $\beta$ -изгиба. Заметная доля конформации этого типа присутствует, по-видимому, также и в водном растворе.

В настоящее время широко исследуются эндогенные опиоидные пептиды Leu- и Met-энкефалины и их многочисленные синтетические аналоги, обладающие уникальными биологическими свойствами. В частности, ряд работ [1–8] посвящен исследованию конформации природных и синтетических энкефалинов различными физико-химическими методами.

Способность энкефалинов эффективно взаимодействовать с опиатными рецепторами позволила выдвинуть гипотезу о том, что в связанном с рецепторами состоянии энкефалины принимают конформацию, имеющую ряд структурных особенностей, характерных для морфина и других опиатов [9–11]. Такая конформация может быть реализована при наличии  $\beta$ -изгибов различных типов в молекулах пептидов [11]. В работах [2–4] показано, что в водных растворах Leu- и Met-энкефалинов и некоторых их аналогов не существует предпочтительной конформации пептидов и не наблюдается образования внутримолекулярных водородных связей, приводящего к сближению концов молекулы. Однако в некоторых органических растворителях [5–7], а также в твердом состоянии [8] энкефалины имеют изогнутую конформацию, стабилизированную внутримолекулярной водородной связью, которая обычно интерпретируется как  $\beta$ -изгиб.

Цель данной работы — исследование конформации Leu- и Met-энкефалинов и их 17 синтетических аналогов для выяснения способности их молекул образовывать  $\beta$ -изгибы.

Спектры КД большинства исследованных в данной работе пептидов имеют более или менее интенсивный положительный максимум в области 215–225 нм. В этой области вид спектра КД пептидов определяется суммой  ${}^1L_a$ -полосы ароматических хромофоров (в данном случае тирозина и фенилаланина) и полосы, соответствующей  $n \rightarrow \pi^*$ -переходу пептидной связи [12]. Образование водородных связей в пептидах и других производных аминокислот приводит к заметным изменениям спектров КД в области  $\lambda < 250$  нм, вызванным в случае пептидов уменьшением интенсивности полосы  $n \rightarrow \pi^*$ -перехода пептидной связи. Такие изменения наблюдаются, в частности, при образовании  $\beta$ -изгибов [13–15]. На основании этих данных уменьшение или увеличение интенсивности полос в спектрах КД пептидов в области 220–230 нм под действием каких-либо факторов обычно интерпретируют в терминах образования или разрушения под действием этих факторов  $\beta$ -изгибов или  $\beta$ -структуры [16, 17].

С этой точки зрения нами были сопоставлены спектры КД пептидов (I)–(XIX) (см. таблицу) в водном растворе при pH 7,2 со спектрами в

Нестандартное сокращение: Gu·HCl — хлористый гуанидиний, символ L-конфигурации в обозначениях аминокислотных остатков опущен.

Характеристики спектров КД пептидов (I)–(XIX) и рассчитанное \* расстояние между ароматическими хромофорами

Номер	Вещество	$\lambda_{\text{макс.}} \text{ нм}$	[ $\theta$ ] <sub>226</sub>		[ $\theta$ ] <sub>275</sub>		$r_{1,4}, \text{ \AA}$	
			в воде	в дioxане	в воде	в дioxане		
								в 8 М Gu·HCl
(I)	Leu-Энкефалин	220	4500	4200	4600	25	28	10,2±0,4**
(II)	Met-Энкефалин	220	4000	3300	5500	25	5	10,3±0,4
(III)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg	220	2500	50	3000	18	3	10,5±0,2
(IV)	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg	220	3500	2600	5500	-2	-22	10,6±0,5
(V)	Tyr-D-Ala-Gly-Phe(NO <sub>2</sub> )-N <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	225	3600	2600	5000			
(VI)	Tyr-D-Ala-Gly-Phe(NO <sub>2</sub> )-Leu	225	1900	800	2800	1050	1020	
(VII)	Tyr-D-Ala-Gly-Phe(NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	226	3500	2300	5500	250	150	
(VIII)	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-N <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ← Gly-H	220	3600	2000	5500			
(IX)	Tyr-D-Ala-Gly-Phe(NO <sub>2</sub> )-N <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ← Met-H	225	3000	1500	3700			
(X)	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH <sub>2</sub>	220	5500	3000	8000			
(XI)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-D-Arg	222	4500	2000	5500	-24	-24	10,0±0,5
(XII)	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu	222	3200	1200	3250	27	-15	11,5±0,6
(XIII)	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu-D-Arg	218	4200	1800	5000	-12	-20	11,1±0,6
(XIV)	Tyr-Gly-Gly-Phe-D-Leu-Arg	217	3700	100	3300	16	2	11,8±0,6
(XV)	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu-Arg	217	6000	2200	5200			
(XVI)	Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Leu-Arg	***	-300	-2250	1000	-20	8	12,6±0,2
(XVII)	Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Gly-ol	***	-800	-5000	250	-70	-67	14,0±0,6
(XVIII)	<Gly-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH <sub>2</sub>	218	7000	6000	7500	-65	-100	
(XIX)	Arg-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH <sub>2</sub>	225	5500	5000	6000	-6	-60	

\* Расстояние между остатками Tyr и Phe<sup>4</sup> рассчитано на основании данных флуоресцентной спектроскопии по методу [18, 19], исходя из величины безылучательного переноса энергии между ними.

\*\* По данным работы [20],  $r_{1,4} = 10,3 \pm 3 \text{ \AA}$ .

\*\*\* Положительный максимум в области 217–250 нм не наблюдается.

флуоресцентной спектроскопии по методу [18, 19], исходя из величины безылуча-

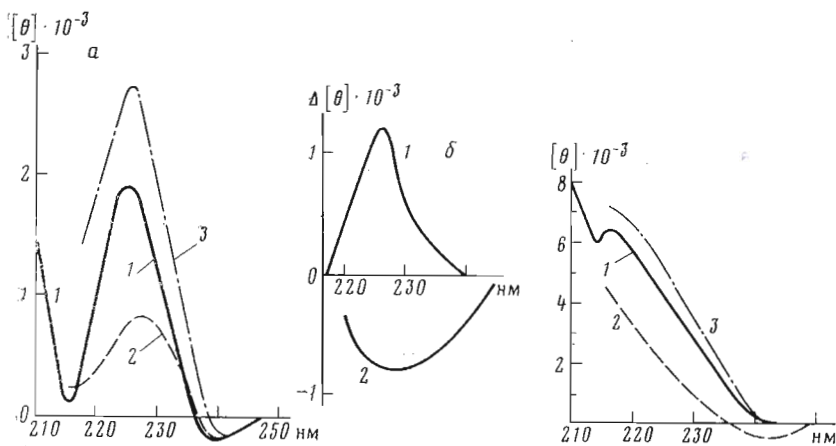


Рис. 1

Рис. 1. *a* — спектры КД аналога (VI) в воде (1), диоксане (2) и 8 М Gu·HCl (3); *б* — разностные спектры, полученные вычитанием из спектра в воде спектра в диоксане (1) или спектра в 8 М Gu·HCl (2). Здесь и на рис. 2, 3  $[\theta]$  — молекулярная эллиптичность (град·см<sup>2</sup>/дмоль), рассчитанная на 1 аминокислотный остаток

Рис. 2

Рис. 2. Спектры КД аналога (XII) в воде (1), диоксане (2) и 8 М Gu·HCl (3)

8 М растворе хлористого гуанидиния, разрушающего β-изгибы, и в диоксане (растворитель, способствующий их образованию) [13].

На основании данных таблицы исследованные вещества могут быть разделены на несколько групп. Для спектров КД аналогов (I) — (XII) характерно наличие положительной полосы с максимумом при 220–225 нм для растворов в воде, более низкие значения эллиптичности в этой области для растворов в диоксане и более высокие в случае растворов в 8 М Gu·HCl. При этом влияние диоксана и хлористого гуанидиния на спектр КД максимально при 226–227 нм.

Все отмеченные особенности можно наблюдать в спектре аналога (VI), представленном на рис. 1; в разностном спектре этого соединения наблюдается четкий максимум при 226 нм. В области 270–280 нм спектры КД аналога (VI) в воде и диоксане практически не различаются. Поскольку спектр КД пептидов в этой области определяется только <sup>1</sup>L<sub>b</sub>-полосой ароматических хромофоров, можно предположить, что окружение боковых цепей тирозина и фенилаланина аналога (VI) в воде и диоксане различается мало. Таким образом, изменения спектра в более коротковолновой области можно приписать образованию в диоксане β-изгиба. Пептид в конформации β-изгиба в заметной концентрации присутствует, по-видимому, также и в водном растворе, поскольку под действием Gu·HCl эллиптичность возрастает.

Для большинства других пептидов этой группы диоксан оказывает влияние на спектр как в коротковолновой области, так и в области 270–280 нм (см. таблицу): для пептидов (II) — (XII) под действием диоксана наблюдается уменьшение интенсивности положительной полосы при 220–230 нм в 1,3–3 раза, причем соответствующие разностные спектры имеют максимум при 226–227 нм (как на рис. 1б). Влияние диоксана на спектр КД Leu-энкефалина более слабое, чем для других пептидов этой группы, хотя имеет то же направление. Увеличение интенсивности положительной полосы в области 220–230 нм, вызываемое хлористым гуанидинием, для пептидов (I) — (XI) составляет 8–50%, для аналога (XII) он меньше 3%. По-видимому, конформация β-изгиба пептида (XII) в водном растворе практически не осуществляется или изменения эллиптичности за счет ее разрушения под действием хлористого гуанидиния компен-

сируются уменьшением интенсивности полосы вследствие изменения окружения ароматических хромофоров.

Величины параметра  $r_{1,4}$  для пептидов (I) — (IV), (XI) близки друг к другу и лежат в интервале 10,0—10,6 Å. Эти значения согласуются с литературными данными для аналогов энкефалинов, содержащих в положении 4 триптофан вместо фенилаланина [19]. Для аналога (XII) значение  $r_{1,4}$  более высокое — 11,5 Å. Это согласуется с высказанным выше предположением об отсутствии в водном растворе аналога (XII) конформации  $\beta$ -изгиба, наличие которой должно уменьшать усредненное для всех конформеров значение  $r_{1,4}$ , определяемое методом флуоресценции.

В спектрах КД аналогов второй группы (XIII) — (XV) положительный максимум смещен по сравнению со спектрами пептидов (I) — (XII) в более коротковолновую область (см., например, рис. 2). В работе [14] было показано, что взаимодействие ароматического кольца тирозина и боковой цепи лизина, несущей положительный заряд, приводит к уменьшению интенсивности положительной полосы в области 220—230 нм в спектрах некоторых производных тирозина примерно в 4 раза. Можно предположить, что аналогичное взаимодействие положительно заряженной боковой цепи аргинина-6 с боковой цепью тирозина имеет место в молекулах пептидов (XIII) — (XV), поскольку при уменьшении интенсивности полосы, соответствующей  $^1L_a$ -линии тирозина, положение максимума их суммарного спектра будет приближаться к длине волны, соответствующей максимуму  $^1L_a$ -линии фенилаланина (219 нм [13]). Сближение боковых цепей аргинина и тирозина достигается, по-видимому, за счет наличия в положении 5 пептидной цепи аналогов (XIII) — (XV) *D*-лейцина. Характерно, что аналог (XII), также имеющий *D*-лейцин в положении 5, но не содержащий аргинина, имеет такой же спектр, как пептиды первой группы.

Влияние диоксана и хлористого гуанидиния на спектры КД аналогов (XIII) — (XV) имеет то же направление, что и для пептидов (I) — (XII) (см. рис. 2), но максимумы на соответствующих разностных спектрах не выявляются. Тем не менее однозначный вывод об отсутствии  $\beta$ -изгибов для аналогов (XIII) — (XV) в воде и диоксане на основании этих данных сделать нельзя, поскольку для этих пептидов наблюдается значительное изменение спектров КД в области 270—280 нм (см. таблицу) в зависимости от природы растворителя, свидетельствующее о значительном изменении окружения ароматических хромофоров. Последний эффект может компенсировать изменение интенсивности полосы  $n \rightarrow \pi^*$ -перехода пептидной связи, связанное с образованием или разрушением  $\beta$ -изгиба. Параметр  $r_{1,4}$  для пептидов (XIII) и (XIV) составляет 11,1 и 11,8 Å, что превышает значения  $r_{1,4}$ , рассчитанные для большинства аналогов, рассмотренных выше. По-видимому, в водном растворе этих аналогов, так же как и в случае пептида (XII) (см. выше), конформация  $\beta$ -изгиба не представлена.

Два аналога из приведенных в таблице — (XVI) и (XVII) — имеют *N*-метилированный фенилаланин в положении 4. Характерной особенностью спектров КД водных растворов этих пептидов (см., например, рис. 3) являются отрицательные значения эллиптичности во всей исследованной спектральной области, что позволяет предположить значительные отличия их конформации от конформации аналогов (I) — (XV). Так же как и в случае пептидов (I) — (XII), на разностном спектре (см. рис. 3б) выявляется четкий максимум при 227 нм, который был интерпретирован выше как следствие образования в диоксане конформации  $\beta$ -изгиба. В водном растворе аналогов (XVI) и (XVII) равновесие, по-видимому, в значительной степени смещено в сторону образования  $\beta$ -изгиба по сравнению с прочими исследованными пептидами, поскольку хлористый гуанидиний значительно изменяет вид спектров, причем его влияние максимально при 227 нм (см. рис. 3б). Значение  $r_{1,4}$  для аналогов (XVI) и (XVII) превышает соответствующие значения для пептидов, рассмотренных выше (см. таблицу), т. е. они, вероятно, имеют менее компактную структуру в водном растворе вследствие наличия  $\text{MePhe}^4$  вместо  $\text{Phe}^4$ .

Аналоги (XVIII) и (XIX), у которых тирозин является второй аминокислотой, имеют более низкую биологическую активность [21]. Диоксан

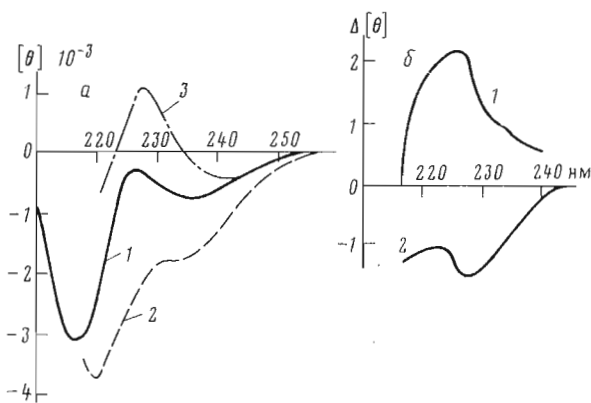


Рис. 3. *a* — Спектры КД аналога (XVI) в воде (1), диоксане (2) и 8 М Gu-HCl (3); *б* — разностные спектры, полученные вычитанием из спектра в воде спектра в диоксане (1) или спектра в 8 М Gu-HCl (2)

и хлористый гуанидинный влияют на спектры КД этих аналогов слабее, чем на спектры прочих исследованных в данной работе пептидов (см. таблицу), причем максимумы на разностных спектрах не выявляются, т. е. методом КД конформация  $\beta$ -изгиба для аналогов (XVIII), (XIX) не обнаруживается.

Таким образом, исследование спектров КД для большинства изученных в данной работе биологически активных аналогов энкефалинов позволяет предположить наличие  $\beta$ -изгибов их структуры для растворов в диоксане. Для значительной части исследованных пептидов заметная концентрация вещества в конформации  $\beta$ -изгиба содержится, по-видимому, также и в водном растворе. Расстояние между ароматическими аминокислотами в молекулах этих пептидов составляет 10,2–14 Å, что также согласуется с предположением о наличии изогнутой структуры [10]. Полученные значения  $r_{1,4}$  в водном растворе (по крайней мере для половины аналогов, для которых этот параметр измерен) не противоречат гипотезе о топографической аналогии между опиатами и энкефалинами, для реализации которой требуется, чтобы расстояние между ароматическими хромофорами составляло 8–10,5 Å [10].

### Экспериментальная часть

Исследованные нами пептиды были синтезированы классическими методами пептидной химии в растворе и охарактеризованы величиной удельного оптического вращения, данными аминокислотного анализа и значением хроматографической подвижности в различных системах [21]. Результаты измерения биологической активности исследованных пептидов опубликованы в работах [21, 22].

Спектры КД получали с помощью дихрографа JASCO 40AS с использованием ячеек с длиной оптического пути 1 и 10 мм. Результаты представляли в виде зависимости молярной эллиптичности ( $[\theta]$ , град·см<sup>2</sup>/дмоль), рассчитанной на один аминокислотный остаток, от длины волны. Все измерения КД проводили в интервале температур 22–25° С. Концентрация растворов, определенная по навеске сухого вещества, составляла  $(1-4) \cdot 10^{-4}$  М для спектров в области  $\lambda < 250$  нм и  $(1-2) \cdot 10^{-3}$  М для области  $\lambda > 250$  нм. В качестве растворителей использовали 0,025 М фосфатный буфер (рН 7,2), диоксан для УФ-спектроскопии производства Merck (ФРГ) и 8 М раствор хлористого гуанидиния (BDH, Англия) в фосфатном буфере (рН 7,2).

Спектры флуоресценции получали на корректирующем спектрофлуориметре SPF-500 (Aminco, США). Расчет  $r_{1,4}$  проводили по формуле  $r_{1,4} = R_0 \sqrt[3]{E^{-1} - 1}$  [18]. При расчете использовали значение критического расстояния Форстера  $R_0 = 12,1 \text{ \AA}$  [20, 23]. Для расчета эффективности переноса энергии  $E$  измеряли интенсивности флуоресценции пептида ( $f$ ), метилового эфира тирозина (XX) ( $f_{\text{Tyr}}$ ) и модельного пептида *D*-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg (XXI) ( $f_{\text{Phe}}$ ) при длине волны 302 нм (максимум спектра флуоресценции Tyr) при возбуждении светом с длиной волны 257 нм (максимум спектра возбуждения Phe). Величину  $E$  рассчитывали по формуле [18]

$$E = \frac{f - f_{\text{Tyr}} - f_{\text{Phe}}}{(\epsilon_{\text{Phe}}/\epsilon_{\text{Tyr}}) f_{\text{Tyr}} - f_{\text{Phe}}},$$

где  $\epsilon_{\text{Tyr}}$  и  $\epsilon_{\text{Phe}}$  — молекулярные коэффициенты поглощения пептидов (XXI) и (XX) при 257 нм. Каждое значение  $r_{1,4}$ , приведенное в таблице, представляет собой среднее значение 3–6 измерений. В таблице дана также средняя ошибка. Для измерений флуоресценции использовали растворы пептидов в 0,025 М фосфатном буфере, pH 7,2, приготовленном на деионизованной дистиллированной воде. Концентрации пептидов составляли  $(2-2,5) \cdot 10^{-5}$  М и рассчитывались исходя из значений поглощения их растворов при 275 нм. Все флуоресцентные измерения проводили при постоянной температуре 20° С.

Автор выражает глубокую благодарность В. В. Шубину (Институт биохимии АН СССР им. А. Н. Баха) за помощь в проведении экспериментов по КД-спектроскопии, а также В. В. Анохиной (Ленинградский государственный университет им. А. А. Жданова) и Ж. Д. Беспаловой (ВКНЦ АМН СССР) за предоставление образцов синтезированных ими пептидов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Garbay-Jaureguiberry C., Marion D., Fellion E., Roques B. P. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1982, v. 20, № 5, p. 443–450.
2. Fischman A. J., Riemen M. W., Cowburn D. *FEBS Lett.*, 1978, v. 94, № 2, p. 236–240.
3. Zetta L., Cabassi F., Tomatis R., Guarneri M. *Eur. J. Biochem.*, 1979, v. 95, № 2, p. 367–376.
4. Higashijima T., Kobayashi J., Nagai U., Miyazawa T. *Eur. J. Biochem.*, 1979, v. 97, № 1, p. 43–57.
5. Stimson E. R., Meinwald Y. C., Scheraga H. A. *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 9, p. 1661–1671.
6. Sudha T. S., Balaram P. *FEBS Lett.*, 1981, v. 134, № 1, p. 32–36.
7. Khaled M. A., Long M. M., Thompson W. D., Bradley R. J., Brown G. B., Urry D. W. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1977, v. 76, № 2, p. 224–231.
8. Han S.-L., Stimson E. R., Maxfield F. R., Scheraga H. A. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1980, v. 16, № 2, p. 173–182.
9. Roques B. P., Garbay-Jaureguiberry C., Oberlin R., Anteuinis M., Lala A. K. *Nature*, 1976, v. 262, № 5571, p. 778–779.
10. Schiller P. W., Yam C. F., Martin L. *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 9, p. 1831–1838.
11. Bradbury A. F., Smyth D. S., Snell C. R. *Nature*, 1976, v. 260, № 5547, p. 165–166.
12. Frič I., Kodíček M., Procházka Z., Jošt K., Blaha K. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1974, v. 39, № 5, p. 1290–1302.
13. Cann J. R. *Biochemistry*, 1972, v. 11, № 14, p. 2654–2659.
14. Rae I. R., Leach S. L., Minasian E., Smith J. A., Zimmerman S. S., Weigold J. A., Hodes Z. I., Nemethy G., Woody R. W., Scheraga H. A. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1981, v. 17, № 5, p. 575–592.
15. Raghavendra K., Ananthanarayanan V. S. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1981, v. 17, № 4, p. 412–419.
16. Cann J. R., Stewart J. M., Matsueda G. R. *Biochemistry*, 1973, v. 12, № 19, p. 3780–3788.
17. Soos J., Berzetei I., Bajusz S., Ronai A. Z. *Life Sci.*, 1980, v. 27, № 2, p. 129–133.
18. Fairclough R. H., Cantor C. R. In: *Methods in Enzymology*/Eds Hirs C. H. W., Timasheff S. N. N. Y.: Acad. Press, 1978, v. 48, p. 347–379.
19. Schiller P. W., St-Hilaire J. J. *Med. Chem.*, 1980, v. 23, № 2, p. 290–294.
20. Бегиньш Я. П., Боброва И. В., Вестерман Б. Г., Подиный Л. У., Розенблюм С. А., Никифорович Г. В. *Биоорганическая химия*, 1982, т. 8, № 4, с. 447–452.
21. Анохина В. В. Синтез и исследование свойств энкефалинов и их структурных аналогов. Дис. ... канд. хим. наук. Л.: ЛГУ, 1981.

22. Беспалова Ж. Д., Коробов Н. В., Тигоев М. И., Чиченков О. Н. Фармакол. и токсикол., 1982, № 2, с. 39-44.
23. Ефремов Е. С., Филагова М. П., Реугова Т. О., Степанова Л. Н., Рейссман Э., Иванов В. Т. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 9, с. 1169-1180.

Поступила в редакцию  
18.XI.1983  
После доработки  
12.XII.1983

## CONFORMATIONAL STUDIES OF ENKEPHALINS BY CIRCULAR DICHROISM AND FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

STREL'TSOVA Z. A.

*All-Union Cardiology Research Center, Academy of Medical Sciences  
of the USSR, Moscow*

Conformation of Leu- and Met-enkephalins and their 17 synthetic analogues was studied by CD and fluorescence spectroscopy both in dioxane and aqueous solutions. The results obtained indicate the  $\beta$ -turn presence in dioxane solution for the most of the peptides under study. An appreciable percentage of the conformations of this type seems to exist in aqueous solutions as well.