



УДК 577.175.82.012.7

## ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ ЦИКЛОАНАЛОГА

ЭНКЕФАЛИНА  $\overline{\text{Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu}}$ 

*Балодис Ю. Ю., Вестерман В. Г., Восекалма И. А.,  
Боброва И. В., Икифорович Г. В., Чиненс Г. И.*

*Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Средствами теоретического конформационного анализа, флуоресцентного анализа и КД-спектроскопии исследована пространственная структура молекулы циклоаналога энкефалина  $\overline{\text{Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu}}$ . Показано, что, несмотря на высокую конформационную подвижность циклоаналога, набор его низкоэнергетических структур лишь частично сходен с таким же набором для природного пептида. Обсуждаются конформационные аспекты возможных механизмов взаимодействия молекулы циклоаналога со специфическими рецепторами энкефалина.

В предыдущем сообщении [1] был описан синтез и биологические свойства ряда линейных и циклических аналогов нейропептида энкефалина Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (I), пептидов Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys (II), Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (III) и  $\overline{\text{Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu}}$  (IV). Было показано, в частности, что соединение (IV), будучи конформационно ограниченным, обладает сравнительно невысоким уровнем биологической активности и сродства к различным типам опиатных рецепторов. Последнее свойство может быть связано именно с конформационными особенностями рассматриваемого циклоаналога: в настоящей работе эти особенности исследованы с помощью методов теоретического конформационного анализа в попарно-аддитивном приближении, флуоресцентного анализа и КД-спектроскопии.

Результатом конформационных расчетов явилось нахождение набора возможных низкоэнергетических конформаций пептидного остова молекулы  $\overline{\text{Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu}}$ , состоящего из 24 структур, подробно описанных в табл. 1 ( $\Delta U = U - U_{\text{min}}$  для этих структур не более 8,5 ккал/моль). Расчетные методы, использованные для получения данных табл. 1, позволяют также построить потенциальные профили изменения внутримолекулярной энергии  $U$  при вращения боковых цепей остатков Tyr, Phe и Leu для каждой из структур остова, приведенных в табл. 1. Таким образом появляется возможность теоретической оценки структурных характеристик, которые могут иметь значение при взаимодействии молекулы со специфическими для энкефалина рецепторами. К таковым относится, в частности, «усредненная» взаимная ориентация ароматических ядер остатков Tyr и Phe. В табл. 2 знаком «х» отмечены допустимые (в пределах  $\Delta U \leq 8,5$  ккал/моль) значения двугранного угла  $\chi_1$  упомянутых остатков с точностью до принадлежности к трем наиболее четко выраженным ротамерам боковых цепей:  $\sim 60^\circ$ ,  $\sim 180^\circ$  и  $\sim -60^\circ$  (отсчет значений углов согласно [2]). На рис. 1 изображена гистограмма, иллюстрирующая распределение расстояний между центрами ароматических колец остатков Tyr и Phe, рассчитанных для всех сочетаний ротамеров, возможных по данным табл. 2. Среднее значение этого расстояния оказалось равным  $r = 12,2 \pm 0,2 \text{ \AA}$ , что соответствует величине эффективности безызлучательного переноса энергии между ароматическими ядрами Phe и Tyr:  $T = 0,49 \pm 0,03$ .

Эта расчетная оценка оказалась в хорошем согласии с экспериментальными данными для соединения (IV):  $T = 0,48 \pm 0,03$ ,  $r = 12,3 \pm 0,3 \text{ \AA}$ . Можно отметить, что измеренные расстояния Tyr-Phe для линейных пепти-

Описание низкоэнергетических структур пептидного остова циклопептида Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu —  
Значения двугранных углов приведены в градусах

Структура остова *	Lys		Tyr		Gly		Gly		Phe		Leu		$\Delta U$ , ккал/моль
	$\Phi$	$\Psi$	$\Phi$	$\Psi$	$\Phi$	$\Psi$	$\Phi$	$\Psi$	$\Phi$	$\Psi$	$\Phi$	$\Psi$	
BBBBBL	-120	138	-133	136	-65	-44	-51	-65	-138	142	42	94	0,00
BBBBBB	-120	124	-419	-45	-67	103	-70	58	-139	-53	-147	115	0,35
BBHLRR	-120	141	-130	144	84	-53	81	53	-121	-47	-121	-42	1,75
BBBBBB	-120	148	-113	132	-82	47	-89	-59	-125	-45	-148	126	2,35
BBHLRB	-120	143	-127	153	90	-49	84	41	-129	-53	-144	122	2,80
BBLLBR	-100	128	-148	155	73	63	51	63	-130	152	-99	119	3,22
BBBBBR	-120	137	-113	-49	-82	86	-63	64	-125	-49	-123	-43	3,30
BRLLRB	-120	126	-123	-42	-49	-44	75	44	-126	-51	-141	119	3,56
BBBBBR	-120	130	-115	-41	-48	-49	90	-54	-95	-21	-94	-38	3,68
BRBHRB	-120	144	-111	-28	-63	79	49	-108	-110	-32	-106	110	4,09
BRBHRB	-120	140	-110	-36	-71	74	77	-118	-126	-36	-37	-77	4,12
BBBBLB	-121	120	-143	166	105	-95	-75	79	41	89	41	58	5,05
RRBHRB	-125	-30	-134	-63	-97	64	80	-89	-105	-35	-75	140	5,46
BRLLRR	-120	139	-114	-46	-65	-51	72	56	-119	-47	-118	-44	6,07
BBBBRR	-120	121	-141	155	-80	-67	-70	105	-60	-21	-74	-9	6,21
BBBHRB	-120	125	-135	165	99	-55	105	-45	-86	-24	-93	-42	6,96
BRLLRB	-120	141	-99	-27	74	43	-76	-54	-125	-44	-153	124	7,22
BRBHLB	-120	135	-112	-37	-59	-32	98	-47	-108	72	48	-29	7,22
RLHLBL	-99	-58	55	133	93	-93	-50	-60	-141	178	-80	116	7,25
BBLLRB	-120	143	-119	145	68	92	-56	69	-142	-55	-152	108	7,54
BBLLRR	-120	148	-121	134	64	80	-51	75	-123	-47	-126	108	7,78
BBHLRB	-120	110	-149	159	59	67	76	-84	2	114	-81	108	7,79
BBLHRR	-119	125	-21	109	82	66	60	-124	-124	-16	-38	-88	8,49
BRBHLB	-120	154	-100	-38	-77	57	56	-87	-123	156	54	83	8,52

\* В терминах локальных минимумов потенциальных карт мептамов N-ацетилдиглицилового остатков — областей с центрами: B —  $\Phi \sim 140^\circ$ ,  $\Psi \sim 140^\circ$ ; R —  $\Phi \sim 60^\circ$ ,  $\Psi \sim 60^\circ$ ; L —  $\Phi \sim 60^\circ$  и H —  $\Phi \sim 140^\circ$ ,  $\Psi \sim 80^\circ$ . Расположение боковых цепей в приведенных низкоэнергетических структурах является также оптимальным по значениям внутримолекулярной энергии  $\Delta U$ .

Допустимые ротамеры боковых цепей остатков Tyr и Phe  
циклоаналога  $\text{Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu}^1$ \*

Структура остова	$\chi_{\text{Tyr}}^1$			$\chi_{\text{Phe}}^1$		
	60°	180°	-60°	60°	180°	-60°
<u>BBBBBL</u>		x	.....	x	.....	x
<u>BRBBRB</u>		x	.....			x
<u>BBHLRR</u>	x	x	x		x	x
<u>BBBRRB</u>	x	x	.....		x	x
<u>BBHLRB</u>	x		x			x
<u>BLLBR</u>	x		x			x
<u>BRBBRR</u>		x			x	x
<u>BRRLRB</u>		x	x			x
<u>BRRHRR</u>		x				x
<u>BRBHRR</u>	x	x	.....	x	x	x
<u>BRBHRR</u>	x	x	.....	x	x	x
<u>BBHBBL</u>	x	x			x	x
<u>RRBHRR</u>	x		x	x	x	x
<u>BRRLRR</u>		x	x		x	x
<u>BBHBR</u>	x	x		x	x	x
<u>BBHHR</u>	x	x			x	x
<u>BLLRRB</u>	.....	x	.....		x	x
<u>BRRHBL</u>		x			x	x
<u>RLHLBL</u>			x			x
<u>BBLBRB</u>		x				x
<u>BBLRR</u>		x				x
<u>BBLHLB</u>	x		x			x
<u>BBLHRR</u>		x		x	x	
<u>BRHBL</u>		x	.....		x	.....
Заселенности ротаме- ров в циклоаналоге	0,29	0,50	0,21	0,14	0,33	0,53
Заселенности ротаме- ров в энкефалине**	I 0,2 II 0,17 III 0,01	0,2 0,83 0,45	0,6 0,54	0,13 0,16 0,10	0,39 0,26 0,27	0,48 0,58 0,63

\* Подчеркивание сплошной чертой означает наличие данной структуры фрагмента Tyr-Gly-Gly-Phe в расчетном наборе конформаций молекулы энкефалина, полученном для значения диэлектрической постоянной 3,5 [5, 8], а штриховой чертой — 81 [3, 5].

\*\* I — расчет; II — эксперимент [6], для ротамеров со значениями  $\chi_{\text{Tyr}}^1$  180 и -60° приведено суммарное значение заселенностей; III — эксперимент [7].

дов (III)  $r=11,6\pm 0,4$  Å и (II)  $r=11,5\pm 0,4$  Å в пределах погрешности эксперимента практически совпадают с величиной  $r$  для циклоаналога; в то же время соответствующие данные для энкефалина несколько отличны от приведенных выше:  $r=10,3\pm 0,3$  Å [3] и  $9,6\pm 0,3$  Å [4] (измерено для пары Tyr — Tyr).

Материал табл. 2 дает возможность также получить расчетную оценку заселенности того или иного ротамера боковой цепи остатка Tyr или Phe в виде  $P_i=n_i/N$ , где  $n_i$  — количество «попаданий» данной боковой цепи остатка в область  $i$ -го ротамера, а  $N$  — общее количество допустимых вариантов ротамеров, представленных в табл. 2. Такая оценка является, разумеется, не очень точной, но все же пригодной для использования, в чем убеждает в целом удовлетворительное согласие аналогичных оценок, проведенных для расчетных данных, описывающих молекулы энкефалина в водном растворе (см. [3] и [5]) и различных экспериментальных оце-

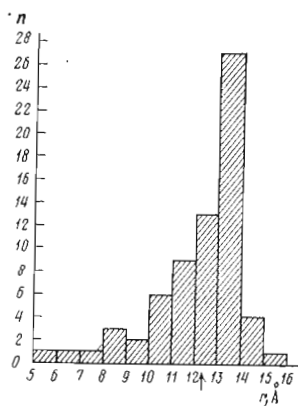


Рис. 1

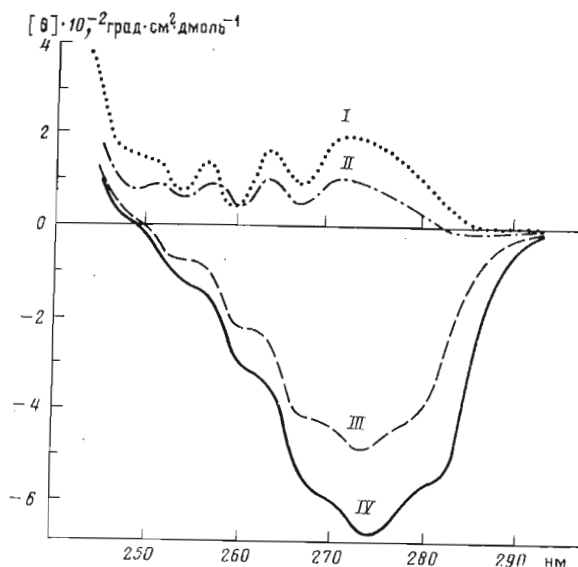


Рис. 2

Рис. 1. Гистограмма распределения расстояния Туг—Phe для циклоаналога Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu. По оси ординат — количество ротамеров. Стрелкой внизу отмечено экспериментальное значение  $r=12,3\pm 0,3$  Å

Рис. 2. Спектры КД соединений (I)–(IV) в воде в ближней ультрафиолетовой области

нок, получаемых методами ЯМР-спектроскопии [6, 7] (см. последние строки табл. 2). При сравнении расчетных оценок заселенностей ротаме-

ров Туг и Phe в случае молекулы Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu и молекулы энкефалина видно, что заселенности ротамеров остатка Phe для обоих соединений остаются почти неизменными. В то же время в распределениях заселенностей ротамеров остатка Туг наблюдаются различия; если в случае энкефалина выражено преобладание ротамера 3, то для циклоаналога характерно преобладание ротамера 2 и примерно равные заселенности ротамеров 1 и 3. Изложенное обстоятельство было использовано нами для интерпретации полученных данных КД-спектроскопии.

Спектры КД пептидов (I)–(IV) в ближней ультрафиолетовой области состоят из перекрывающихся полос дихроичного поглощения  ${}^1L_b$ -перехода ароматических хромофоров остатков Туг и Phe. Для этой области характерно наличие двух типов КД-спектров: для энкефалина и линейного пептида (II) значения молярной эллиптичности  $[\theta]$  положительны, а для линейного гексапептида (III) и циклоаналога (IV) отрицательны (рис. 2). Этот факт, очевидно, может быть согласован с обнаруженным расчетом различием в заселенностях ротамеров остатка Туг для молекул энкефалина и циклоаналога. В дальней ультрафиолетовой области спектры соединений (I), (III), (IV) в целом однотипны и характеризуются двумя положительными максимумами в областях 195–200 и 220–230 нм (рис. 3). КД-спектр соединения (II), в котором остаток Lys ацилирован молекулой энкефалина через  $\epsilon$ -аминогруппу, коренным образом отличается от предыдущих, что может быть связано с изменением конформации этого соединения и, как следствие, с проявляемой им выраженной селективностью при связывании с рецепторами [1].

С целью изучения конформационной устойчивости циклопептида (IV) была исследована также температурная зависимость спектра КД в метиловом спирте (рис. 4). Спектр практически не меняется ни в ближней (рис. 4а), ни в дальней (рис. 4б) ультрафиолетовой области. Можно считать поэтому, что набор конформаций циклопептида в данных условиях устойчив.

Таким образом, данные флуоресцентного анализа и КД-спектроскопии циклоаналога  $\text{Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu}$  не противоречат расчетным данным табл. 1 и 2 о его конформационной подвижности. Ранее уже сообщалось (см. [8]), что элементом, непосредственно взаимодействующим с рецепторами энкефалина, является, по-видимому, фрагмент  $\text{Tyr-Gly-Gly-Phe}$ . В табл. 2 отмечены те конформации этого фрагмента, которые представлены в расчетных наборах структур остова молекулы энкефалина, полученных в предположении частичного моделирования условий «биофазы» рецептора или водного окружения [9]. Видно, что, несмотря на сравнительно высокую в целом конформационную подвижность аналога  $\text{Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu}$ , среди конформаций его остова почти нет сходных с низкоэнергетическими структурами энкефалина в водном растворе (диэлектрическая постоянная 81); в то же время часть конформаций сходна со структурами энкефалина, которые способны реализоваться в непосредственной близости от поверхности рецептора.

Тем не менее, как уже упоминалось, рассматриваемый циклоаналог не характеризуется высоким сродством к рецепторам природного энкефалина. Это обстоятельство может иметь два объяснения: либо структуры остова фрагмента  $\text{Tyr-Gly-Gly-Phe}$ , необходимые для связывания с рецептором (биологически активные конформации), отличны от подчеркнутых в табл. 2, либо решающее значение для комплексобразования имеет ориентация боковой цепи остатка Tyr, которая, как было показано выше, в среднем не одинакова для циклоаналога и энкефалина. В любом случае, однако, можно констатировать, что проведенное в настоящей работе исследование пространственной структуры соединения  $\text{Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu}$  дает материал для более глубокого изучения вопроса о биологически активных конформациях энкефалина, характерных для различных типов его специфических рецепторов.

### Экспериментальная часть

Теоретический конформационный анализ циклоаналога  $\text{Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu}$  проводился в предположении жесткой валентной геометрии с использованием системы потенциальных функций, описанной в работе [10]. Значение диэлектрической постоянной среды принимали равным 3,5; в данном случае, при наличии в молекуле лишь одной ионизированной группы ( $\alpha$ -аминогруппа), результаты расчетов слабо зависят от выбора значения диэлектрической постоянной в широких пределах: 2 — 81. Замыкание цикла осуществлялось с помощью системы параболических потенциалов вида  $U=U_0(r-r_0)^2$ , поддерживающих заданные размеры «фиктивной» валентной связи  $\text{C}^\delta-\text{C}^\epsilon$  лизина ( $U_0=1000$  ккал/моль  $\text{\AA}^2$ ,  $r_0=1,53$   $\text{\AA}$ ; атом  $\text{C}^\epsilon$  лизина при задании валентной геометрии молекулы описывался как атом  $\text{C}^\alpha$ , «завершающий» пептидную группу, включенную в цепь после остатка Leu, что приводит к наличию только двух независимых переменных для боковой цепи остатка Lys:  $\chi_1$  и  $\chi_2$ ) и валентных углов  $\text{C}^\gamma-\text{C}^\delta-\text{C}^\epsilon$  и  $\text{C}^\delta-\text{C}^\epsilon-\text{N}^\epsilon$  ( $U_0=100$  ккал/моль  $\text{\AA}^2$ ,  $r_0=2,552$   $\text{\AA}$ ). На первом этапе расчетов производился отбор принципиально возможных вариантов сочетаний локальных энергетических минимумов пептидного остова (864 варианта; учитывались минимумы  $B$  и  $R$  для остатка Lys,  $B$ ,  $R$ ,  $L$  и  $II$  для остатка Gly и  $B$ ,  $R$  и  $L$  для остальных остатков), допускающих сближение атомов  $\text{C}^\beta$  первого остатка и  $\text{C}^\alpha$ , замыкающего концевую пептидную группу, на расстояние менее 4,5  $\text{\AA}$  при предельном варьировании двугранных углов на  $\pm 30^\circ$  от центров локальных минимумов. Таких вариантов оказалось 331. Для каждого из них на уровне полной молекулы была проведена минимизация внутримолекулярной конформационной энергии  $U$ , предваряемая опти-

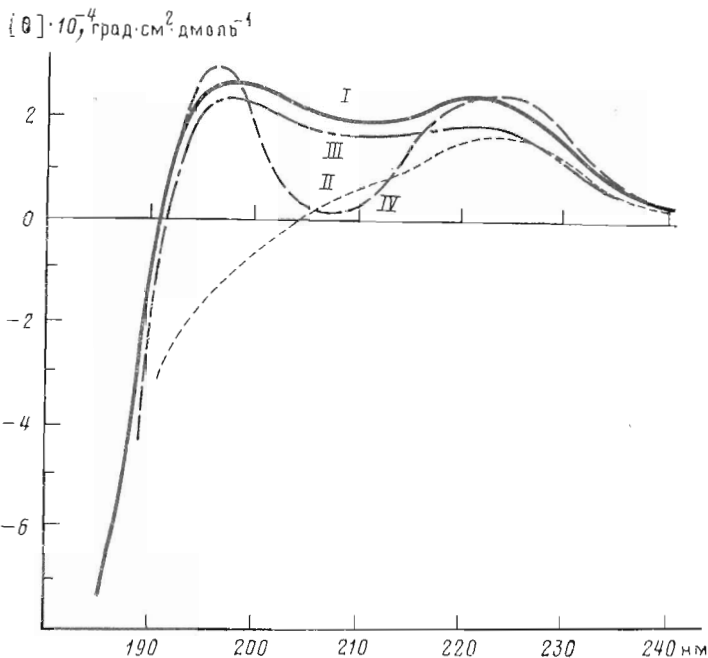


Рис. 3. Спектры КД соединений (I)–(IV) в воде в дальней ультрафиолетовой области

мизацией взаимного пространственного расположения боковых цепей всех остатков молекулы (включая и Lys) по алгоритму [11]. Таким образом было достигнуто, в частности, стерически оптимальное замыкание цикла; незначительные «остаточные» величины «энергии замыкания» не учитывались при построении энергетической иерархии структур табл. 1.

Экспериментальную оценку расстояния  $r$  между центрами ароматических колец остатков Tyr и Phe проводили так же, как и в работе [3], т. е. по формуле

$$r = r_0 \sqrt[6]{1/T - 1},$$

где  $r_0$  — радиус Ферстера — расстояние между хромофорами при величине эффективности безызлучательного переноса энергии 50% [12],  $T$  — эффективность безызлучательного переноса энергии. Значение  $r_0 = 12,4 \text{ \AA}$  взято в соответствии с данными работ [13], [14]. Величину  $T$  определяли сопоставлением скорректированных спектров возбуждения исследуемого пептида и дипептида Tyr-D-Arg при двух длинах волн:  $\lambda_1 = 260 \text{ нм}$  (область поглощения остатков Phe и Tyr) и  $\lambda_2 = 280 \text{ нм}$  (остаток Tyr):

$$T = \frac{\varepsilon_{\text{Tyr}}^{\lambda_1}}{\varepsilon_{\text{Phe}}^{\lambda_1}} \left( \frac{F^{\lambda_1} F_0^{\lambda_2}}{F^{\lambda_2} F_0^{\lambda_1}} - 1 \right),$$

где  $\varepsilon_{\text{Tyr}}^{\lambda}$  и  $\varepsilon_{\text{Phe}}^{\lambda}$  — экстинкции остатков Tyr и Phe при длине волны  $\lambda$  (определены из спектров модельных соединений Tyr-D-Arg и Ac-Phe-NHMe), а  $F^{\lambda}$  и  $F_0^{\lambda}$  — интенсивности флуоресценции для исследованных энкефалинов и дипептида Tyr-D-Arg при возбуждении светом с длиной волны  $\lambda$ . Спектры флуоресценции снимали на приборе Hitachi 850 (Япония).  $\lambda_{\text{em}} = 305 \text{ нм}$ , ширина щели монохроматора возбуждения 1,0 нм, монохроматора эмиссии — 2,5 нм. Проводилась коррекция эффектов «внутреннего фильтра». Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду, концентрации олигопептидов не превышали 50 мкМ. Спектры поглощения снимали на приборе Pye Unicam SP 1800 (Англия).

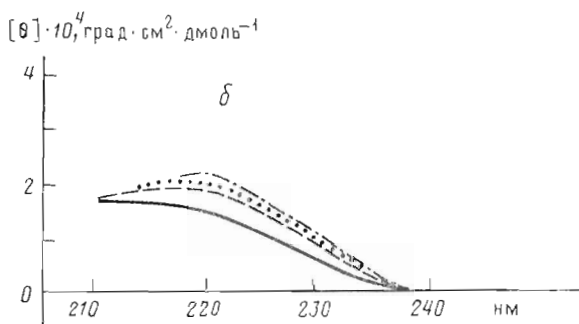
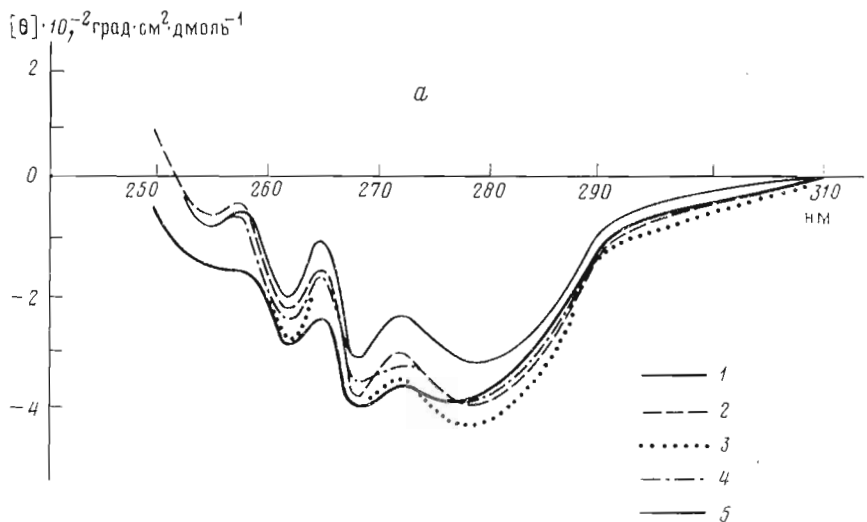


Рис. 4. Температурная зависимость спектров КД соединения  $\text{Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu}^{-1}$  (IV) в метиловом спирте в ближней (а) и дальней (б) ультрафиолетовой областях. Приведены спектры при температуре 23 (1), 0 (2), -40 (3), -80 (4) и -95°С (5)

Спектры КД записывали на дихрографе Jobin — Yvon Mark III (Франция). Дихрограф калиброван по 10-камфарсульфоновой кислоте и эпиандростерону. Для записи спектров в области 180—250 нм использовали кюветы из плавленого кварца фирмы Hellma с длиной оптического пути 0,1—0,01 см. Концентрация растворов  $10^{-3}$ — $10^{-4}$  М. Измерения в водных растворах проводились при 23—25°С; температурная зависимость в метиловом спирте измерялась с помощью приставки к дихрографу Varyo-cyostat.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Боброва И. В., Абиссова Н. А., Розенталя Г. Ф., Никифорович Г. В., Чупенс Г. И. Биоорганич. химия, 1985, т. 11, № 11, с. 1457—1467.
2. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Pure Appl. Chem., 1974, v. 40, p. 291—308.
3. Бетильши Я. Р., Боброва И. В., Вестерман Б. Г., Подишнь Л. У., Розенблют С. А., Никифорович Г. В. Биоорганич. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 447—452.
4. Schiller P. W. Int. J. Peptide and Protein Res., 1983, v. 21, p. 307—312.
5. Никифорович Г. В. Конформационно-функциональные отношения олигопептидов. Автореф. дис. на соискание уч. ст. доктора биол. наук. Купавна: НИИ по ВИХС, 1982. 47 с.
6. Zetta L., Cabassi F., Tomatis R., Guarneri M. Eur. J. Biochem., 1979, v. 95, p. 367—376.
7. Bleich H. E., Day A. R., Freer R. J., Glasel J. A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 74, № 2, p. 592—598.
8. Никифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чупенс Г. И. Конформации пептидных биорегуляторов. М.: Медицина, 1983. 191 с.

9. *Nikiforovich G. V., Rozenblit S. A., Chipens G. I.* In: Chemistry of Peptides and Proteins, vol. 1/Eds Voelter W., Wunsch E., Ovchinnikov J., Ivanov V. B.—N. Y.: Walter de Gruyter and Co., 1982, p. 407–414.
10. *Nikiforovich G. V., Leonova V. I., Galaktionov S. G., Chipens G. I.* Int. J. Peptide and Protein Res., 1979, v. 13, p. 363–373.
11. *Никифорович Г. В., Шендерович М. Д., Балодис Ю. Ю.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 2, с. 179–188.
12. *Förster T.* Ann. Phys., 1948, B. 2, S. 55–75.
13. *Ефремов Е. С., Филагова М. П., Реутова Т. О., Степанова Л. Н., Рейссман З., Иванов В. Т.* Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 9, с. 1169–1180.
14. *Garbay-Jaureguiberry C., Roques B. P., Oberlin R., Anteunis M., Lala A. K.* Biophys. and Biochem. Res. Commun., 1976, v. 71, № 2, p. 558–565.

Поступила в редакцию  
25.III.1985  
После доработки  
15.V.1985

## SPATIAL STRUCTURE OF AN ENKEPHALIN CYCLOANALOGUE

Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

BALODIS J. J., VESTERMAN B. G., VOSEKALNA I. A.,  
BOBROVA I. V., NIKIFOROVICH G. V., CHIPENS G. I.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences  
of the Latvian SSR, Riga*

The spatial structure of an enkephaline cycloanalogue Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu has been investigated by means of energy calculations, fluorescence and CD-spectroscopy. Despite the high conformational mobility of the cycloanalogue, little resemblance exists between its and parent peptide's low-energy structures. Conformational factors for possible mechanisms of interaction between specific enkephalin receptors and the cycloanalogue are discussed.