



УДК 547.962:541.63

КОНФОРМАЦИИ [*D*-Arg<sup>2</sup>]ЛЕЙЦИНЭНКЕФАЛИНА  
В ВОДНОМ РАСТВОРЕ*Бетиньш Я. Р., Боброва И. В., Вестерман Б. Г.,  
Подольш Л. У., Розенблит С. А., Нишифорович Г. В.**Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Флуоресцентным и расчетным методами определены расстояния между Tyr<sup>1</sup> и Phe<sup>4</sup> в Leu-энкефалине и его биологически активном аналоге [*D*-Arg<sup>2</sup>]энкефалине. Сопоставление полученных данных показало, что конформерами [*D*-Arg<sup>2</sup>]энкефалина с наибольшими статистическими весами являются структуры *VHNBV* и *BLRBB*. Эти структуры отличаются от предложенных в литературе типов биологически активных конформаций энкефалина.

В настоящее время весьма интенсивно проводятся экспериментальные физико-химические исследования пространственной структуры олигопептидов в растворе. Однако структурная интерпретация их результатов затрудняется тем, что любая экспериментально измеряемая характеристика представляет собой усредненную величину, отражающую вклад всех стабильных конформеров молекулы в растворе. Выделение из этой величины вкладов отдельных конформеров возможно лишь при наличии дополнительной информации о пространственной структуре молекулы (подробнее см. [1]). Такую информацию можно в принципе получить средствами полуэмпирического конформационного анализа, позволяющего выделить набор низкоэнергетических структур остова олигопептида с оптимальным пространственным расположением боковых цепей (например, [2–7]). Структуры, входящие в такой набор, следует, по-видимому, считать равноправными, поскольку их реальные статистические веса в растворе вряд ли можно получить с помощью общепринятых расчетных методов, в которых, как правило, не учитываются влияние растворителя, энтропийные вклады в свободную энергию и пр. Более корректным подходом к проблеме установления пространственной структуры олигопептида в растворе будет, очевидно, совместная интерпретация данных расчета и физико-химического эксперимента. В настоящей работе попытка такой интерпретации предпринята в отношении аналога известного пептида Leu-энкефалина Tyr<sup>1</sup>-*D*-Arg<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup> ([*D*-Arg<sup>2</sup>]энкефалин).

Наличие в молекуле [*D*-Arg<sup>2</sup>]энкефалина (как и самого энкефалина) пары хромофоров (боковые цепи остатков Tyr<sup>1</sup> и Phe<sup>4</sup>) позволяет экспериментально оценить среднее расстояние между ними по величине эффективности безызлучательного переноса энергии ( $T$ ), которую можно определить из сопоставления спектров флуоресценции молекулы при облучении образца светом с длиной волны  $\lambda_1$  260 нм (флуоресценция остатка Tyr под действием как его собственного возбуждения, так и переноса энергии с возбужденного остатка Phe) и  $\lambda_2$  280 нм (возбуждение Phe отсутствует). Достоинством такого метода является возможность измерять средние расстояния между хромофорами непосредственно в исследуемом пептиде без необходимости привлечения данных по его аналогам с отсутствующим донором или акцептором (см. также [8]). Измеренные таким образом величине эффективности переноса энергии и средние расстояния между боковыми цепями остатков Tyr<sup>1</sup> и Phe<sup>4</sup> в водном растворе [*D*-Arg<sup>2</sup>]энкефалина оказались равными соответственно:  $T=0,26\pm 0,03$  и  $r_{14}=14,3\pm 0,4$  Å. Аналогичные величины, найденные нами для Leu-энкефалина, равны  $T=0,71\pm 0,03$  и  $r_{14}=10,3\pm 0,3$  Å и вполне удовлетворительно согласуются с данными для аналога [Tyr<sup>1</sup>]-Leu-энкефалина, полученными в работе [9] ( $r_{14}=9,4$  Å), что свидетельствует о правомерности использо-

**Низкоэнергетические структуры пептидного остова молекулы  
[D-Arg<sup>2</sup>]энкефалина \***

Остаток	Угол	Тип структуры остова **						
		BHNBV	BHRBV	BHNBV	BLRBV	BHBBV	BLBBV	BHLBV
Tyr	$\varphi_1$	-151	-146	-149	-149	-152	-149	-150
	$\psi_1$	140	142	142	143	150	144	135
D-Arg	$\varphi_2$	136	120	142	122	132	126	128
	$\psi_2$	-143	-116	-139	50	-128	49	-128
Gly	$\varphi_3$	107	-58	85	-55	-85	-86	97
	$\psi_3$	-26	-29	-60	-42	75	72	66
Phe	$\varphi_4$	-127	-133	-122	-134	-138	-147	-145
	$\psi_4$	143	147	140	146	154	154	151
Leu	$\varphi_5$	-139	-135	-127	-132	-124	-125	-126
	$\psi_5$	139	139	140	138	139	139	139
$\Delta U$ , ккал/моль		0,0	2,3	3,0	5,1	5,3	6,7	6,9

\* Отсчет углов внутреннего вращения согласно работе [10].

\*\* Принятые обозначения относятся к квадрантам карты потенциальной энергии монопептида B:  $-180^\circ \leq \varphi \leq 0^\circ$ ,  $0^\circ \leq \psi \leq 180^\circ$ ; R:  $-180^\circ \leq \varphi \leq 0^\circ$ ,  $-180^\circ \leq \psi \leq 0^\circ$ ; L:  $0^\circ \leq \varphi \leq 180^\circ$ ,  $0^\circ \leq \psi \leq 180^\circ$ ; H:  $0^\circ \leq \varphi \leq 180^\circ$ ,  $-180^\circ \leq \psi \leq 0^\circ$ .

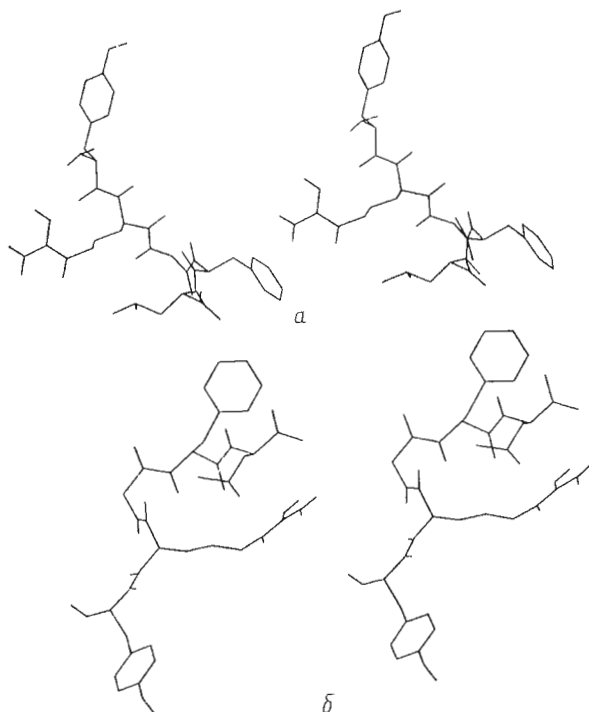
Таблица 2

**Пределы изменения расстояния между центрами ароматических колец остатков  
Tyr<sup>1</sup> и Phe<sup>4</sup>[D-Arg<sup>2</sup>]энкефалина**

Тип структуры остова	Значение угла $\chi_i$ , град	Расстояние $r_i$ , Å		Тип структуры остова	Значение угла $\chi_i$ , град	Расстояние $r_i$ , Å	
		минимальное	максимальное			минимальное	максимальное
BHNBV	180, 40	3,8	8,4	BLRBV	40, 80	9,6	14,2
	180, 180	8,4	12,8		40, -160	13,7	15,9
	180, -60	6,7	12,1		40, -60	12,2	14,8
BHRBV	80, 80	5,2	10,0	BHBBV	180, 80	5,3	10,5
	80, -160	9,6	12,7		180, -160	9,7	13,4
	80, -60	9,1	12,8	-180, -60	7,8	12,3	
	-140, 80	5,1	11,1	BLBBV	60, -80	6,7	10,9
	-140, -160	7,9	12,5		60, 80	6,7	10,4
	-140, -60	9,5	12,9		-140, -80	5,7	11,3
	-60, 80	5,0	10,6		-140, 80	3,1	8,6
	-60, -160	8,3	11,8		-60, -80	6,5	11,3
-60, -60	9,6	13,0	-80, 80		4,7	8,7	
BHNBV	-80, 40	6,5	11,7	BLBBV	40, 80	9,1	13,0
	-80, 180	10,7	15,7		-160, 80	10,0	13,7
	-80, -80	10,8	15,3		-80, 80	6,2	11,2
	-160, 40	4,0	9,7	BHLBV	40, 60	8,6	12,0
	-160, 180	7,5	12,6		-160, 60	6,5	11,2
	-160, -80	8,6	13,3		-80, 60	10,1	13,6
				40, -80	10,0	13,5	
				-160, -80	6,9	11,6	
				-80, -80	10,0	13,9	

важного нами метода оценки средних расстояний между ароматическими хромофорами.

С другой стороны, полуэмпирический конформационный анализ [D-Arg<sup>2</sup>]энкефалина показал, что набор низкоэнергетических структур пептидного остова молекулы ограничивается семью конформерами (табл. 1). В табл. 2 указаны пределы изменений расстояния между центрами ароматических колец остатков Tyr и Phe, рассчитанные для всех



Пространственные структуры *BHHBB* (а) и *BLRBB* (б)  $[D\text{-Arg}^2]$ энкефалина в водном растворе

возможных стерически разрешенных ротамеров боковых цепей  $\text{Tyr}^1$  и  $\text{Phe}^4$  по углу внутреннего вращения  $\chi_1$  для каждой из структур табл. 1 с учетом конформационной подвижности молекулы в пределах данного локального энергетического минимума. Значения углов внутреннего вращения  $\chi_1^T \approx \psi_1, \psi_2, \psi_3, \psi_4, \psi_5$  и  $\chi_1^{\text{Phe}}$ , от которых зависит расстояние  $r_{14}$ , могли отклоняться от величин, приведенных в табл. 1 и 2, на  $\pm 10^\circ$ . Видно, что экспериментально определенному расстоянию  $r_{14}$  соответствует лишь два типа расчетных структур остова: *BHHBB* и *BLRBB*, причем в первой из них расстояние  $r_{14}$ , согласующееся с экспериментом, поддерживается при значении угла  $\chi_1$  остатка  $\text{Tyr}^1 \sim -80^\circ$ , а во второй —  $\sim 40^\circ$ . Структуры *BHHBB* и *BLRBB* представляют собой один и тот же тип пространственной организации пептидного остова, различаясь лишь поворотом плоскости пептидной связи между остатками  $D\text{-Arg}^2$  и  $\text{Gly}^3$  на  $\sim 180^\circ$  (рисунок).

Можно предположить, следовательно, что низкоэнергетические структуры  $[D\text{-Arg}^2]$ энкефалина, приведенные на рисунке, представлены в водном растворе с наибольшими статистическими весами. В случае  $\text{Met}$ -энкефалина пределы изменений расстояния  $r_{14}$  почти для всех расчетных низкоэнергетических структур, описанных в табл. 3, находятся в соответствии с экспериментом, что не дает возможности ограничить круг структур с наибольшим статистическим весом. Аналогичное утверждение справедливо, по-видимому, и для  $\text{Leu}$ -энкефалина: сопоставление результатов, приведенных в работах по расчету пространственных структур  $\text{Met}$ - и  $\text{Leu}$ -энкефалинов [11, 12], обнаруживает почти полное совпадение наборов низкоэнергетических структур остова обеих молекул.

Биологическое тестирование показало, что уровень анальгетической активности  $[D\text{-Arg}^2]$ энкефалина сопоставим с таковым для морфина. Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными ( $ED_{50}$   $[D\text{-Arg}^2]$ -энкефалина равно 5,3,  $\text{Leu}$ -энкефалина — 223 [13] и морфина — 1,9 нмоль/животное). В ряде работ по выявлению биологически активной конформации энкефалина, характерной для образования лиганд-рецепторного комплекса, предлагаются различные структуры пептидного остова моле-

## Изв-онергетические структуры пептидного остова Мет-энкефалина

Остаток	Угол	Типы структур остова												
		BBLLRB	BBHRB	BHRRB	RHRBB	BBLLBB	BBRRB	BHBBB	BRBBB	BRRBB	RLLRB	RBHBB	ELLBB	BHRBL
Tyr	φ	-140	-138	-143	-141	-447	-147	-149	-151	-140	-130	-126	-161	-149
	ψ	426	436	439	-37	133	134	144	153	145	-52	-52	151	444
	χ <sub>1</sub>	-66	-65	-65	-164	-64	165	-176	-54	-58	-73	-56	-69	-67
	χ <sub>1</sub>	93	94	-87	88	-84	77	81	95	-85	91	-85	94	-86
	χ <sub>2</sub>	89	90	90	90	90	97	90	89	90	90	90	89	90
Gly	φ	-83	-75	81	99	-88	-84	79	-50	-50	106	-91	87	82
	ψ	65	82	-76	-74	58	112	-71	-56	-41	45	71	46	-85
Gly	φ	72	87	-59	-59	85	-50	-98	-103	-62	77	79	93	-54
	ψ	59	-69	-42	-30	55	102	120	67	-62	66	-79	25	-43
Phe	φ	-126	-122	-144	-128	-438	-129	-122	-136	-134	-138	-138	-138	-140
	ψ	-48	-47	148	444	133	-50	128	143	129	-53	122	103	148
	χ <sub>1</sub>	-76	-173	66	171	-65	-177	-60	179	-59	-75	-60	-59	69
	χ <sub>2</sub>	96	80	96	80	-79	79	-82	-100	97	96	97	-81	97
Met	φ	-129	-136	-138	-135	-131	-139	-129	-128	-141	-136	-139	-139	50
	ψ	442	449	442	436	139	435	141	137	440	146	141	141	27
	χ <sub>1</sub>	-72	-79	-81	-68	-73	-89	-71	-72	-75	-72	-83	-77	-69
	χ <sub>2</sub>	-171	-69	-69	-67	82	177	82	82	82	-76	-177	85	174
	χ <sub>3</sub>	182	473	-165	477	-472	180	-174	-170	-178	-178	477	-164	-177
ΔU, ккал/моль	0,0	4,2	2,4	2,5	3,3	3,3	3,5	4,1	4,1	5,3	6,4	6,5	6,7	
r*, 14 мин, Å	3,7	6,5	6,9	2,9	4,4	4,4	5,4	4,3	4,3	5,5	10,9	6,6	7,3	
r <sub>1</sub> , макс, Å	9,9	10,8	14,4	40,0	10,2	10,2	9,2	10,0	10,0	10,5	43,6	40,9	41,5	

\* Экспериментальное значение r<sub>14</sub> (10,3±0,3) Å, 9,4 Å [9].

кулы: *BHRBB* [11], *BHBBV* [14] и *BHRBL* [15]. Конформации *BHRBB* и *BHBBV* содержатся также среди структур табл. 1, однако соответствующие диапазоны расстояния  $r_{14}$  (табл. 2) не перекрываются с экспериментальным значением  $r_{14}$ . Таким образом, в данном случае подобные конформации представлены в растворе с малыми статистическими весами, что не исключает, однако, возможности их реализации непосредственно на поверхности специфического рецептора.

### Экспериментальная часть

Leu-энкефалин получен синтезом пептидов в растворе [16]. [*D*-Arg<sup>2</sup>]-энкефалин синтезировали твердофазным способом по известной методике [17] с использованием в качестве носителя сефадекса LH-20 (детали синтеза будут опубликованы отдельно).

Экспериментальную оценку расстояния  $r_{14}$  проводили по формуле

$$r = r_0 \sqrt[6]{\frac{1}{T} - 1}, \quad (1)$$

где  $r_0$  — расстояние между хромофорами при величине эффективности переноса энергии 50% (при отсутствии упорядоченной ориентации рассматриваемых хромофорных групп  $r_0$  12,1 Å [8]), а величину  $T$  определяли из уравнения

$$T = \frac{\varepsilon_{\text{Tyr}}^{\lambda_1}}{\varepsilon_{\text{Phe}}^{\lambda_1}} \cdot \left( \frac{F^{\lambda_1} F_0^{\lambda_2}}{F^{\lambda_2} F_0^{\lambda_1}} - 1 \right), \quad (2)$$

где  $\varepsilon_{\text{Tyr}}^{\lambda}$  и  $\varepsilon_{\text{Phe}}^{\lambda}$  — экстинкции остатков Tyr и Phe при длине волны  $\lambda$  (определены из спектров модельных соединений Ac-Tyr-NHMe и Ac-Phe-NHMe [8]), а  $F^{\lambda}$  и  $F_0^{\lambda}$  — интенсивности флуоресценции для Leu-энкефалина и Tyr при возбуждении светом с длиной волны  $\lambda$ .

Для приготовления растворов использовали дистиллированную деионизованную воду. Концентрации растворов не превышали 50 мкМ. Спектры люминесценции снимали на спектрофлуориметре, изготовленном в Рижском медицинском институте, а спектры адсорбции — на приборе «Pye Unicam SP 1800» (США).

Полуэмпирический конформационный анализ Met-энкефалина и [*D*-Arg<sup>2</sup>]-энкефалина проводили с использованием системы потенциальных функций, описанной в работе [7]. С целью моделирования условий водного окружения значение диэлектрической постоянной  $\epsilon$  принимали равным 81. Схема поиска стабильных структур включала в себя предварительный расчет модельных пептидов Ala-Gly-Gly-Ala-Ala и Ala-*D*-Ala-Gly-Ala-Ala. Конформации, удовлетворяющие условию  $U - U_{\text{мин}} \leq 12$  ккал/моль, рассматривались на уровне полных молекул. Оптимизация пространственного расположения боковых цепей проводилась по алгоритму, описанному в работе [4], что позволило получить потенциальные профили вращения боковых цепей молекулы по углам  $\chi_1$ . В табл. 1 и 3 описаны структуры остова, удовлетворяющие критерию  $U - U_{\text{мин}} \leq 7,5$  ккал/моль при оптимальном расположении боковых цепей.

Биологическое тестирование анальгетической активности Leu-энкефалина и [*D*-Arg<sup>2</sup>]-энкефалина проводилось по известному методу «tail-pinch» (прижатия хвоста) на мышях при интрацестернальном введении препаратов.

Авторы выражают глубокую благодарность Г. И. Чиненсу за интерес и внимание к работе и Н. А. Абиссовой, любезно предоставившей результаты биологического тестирования обоих пептидов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Галактионов С. Г., Никифорович Г. В., Чиненс Г. И., Шендерович М. Д. Ангиотензин. Рига: Зинатне, 1979.
2. Никифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чиненс Г. И. Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 1979, № 2, с. 94–108.

3. Шендерович М. Д., Никифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чипенс Г. И. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 3, с. 318–339.
4. Никифорович Г. В., Шендерович М. Д., Балодис Ю. Ю. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 2, с. 179–188.
5. Никифорович Г. В., Балодис Ю. Ю., Чипенс Г. И. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 5, с. 645–654.
6. Nikiiforovich G. V., Shenderovich M. D., Chipens G. I. FEBS Lett., 1981, v. 126, № 2, p. 180–182.
7. Nikiiforovich G. V., Leonova V. I., Galaktionov S. G., Chipens G. I. Int. J. Pept. Prot. Res., 1979, v. 13, p. 363–373.
8. Ефремов Е. С., Филагова М. П., Реутова Т. О., Степанова Л. Н., Рейссман З., Иванова В. Т. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 9, с. 1169–1180.
9. Schiller P. W., Yam F. C., Prosmann J. J. Med. Chem., 1978, v. 21, p. 1110–1116.
10. IUPAC – IUB commission on biochemical nomenclature. Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains. – Pure. Appl. Chem., 1974, v. 40, p. 291–308.
11. Balodis Yu. Yu., Nikiiforovich G. V., Grinsteine I. V., Vegner R. E., Chipens G. I. FEBS Lett., 1978, v. 86, p. 239–242.
12. Азрем А. А., Голубович В. П., Курнарский Л. И., Галактионов С. Г. В кн.: V Советско-индийский симпозиум по химии природных соединений. Ереван, 1978, с. 8.
13. Kubota M., Nagase O., Amano H., Takagi H., Yajima H. Chem. Pharm. Bull., 1980, v. 28, № 9, p. 2580–2586.
14. Humblet C., De Coen J.-L. In: Peptides, Proc. 5th Amer. Pept. Symp./Eds Goodman M., Meienhofer J. N. Y.: J. Wiley, 1977, p. 88–91.
15. Manavalan P., Motanu F. A. Biopolymers, 1980, v. 19, p. 1943–1973.
16. Боброва И. В., Пансуевич О. С., Чипенс Г. И. Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 1979, № 3, с. 328–332.
17. Библин А. Ю., Кожешникова П. Ю., Власов Г. П. Ж. орган. химии, 1973, т. 43, с. 2046–2048.

Поступила в редакцию  
3.XI.1981

## CONFORMATIONS OF [*D*-Arg<sup>2</sup>]Leu-ENKEPHALIN IN AQUEOUS SOLUTIONS

BETINSH J. R., BOBROVA I. V., VESTERMAN B. G.,  
PODINSH L. U., ROZENBLIT S. A., NIKIFOROVICH G. V.

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

Using the radiationless energy transfer efficiency and semi-empirical conformational analysis, the distances were determined between the Tyr<sup>1</sup> and Phe<sup>4</sup> chromophores in Leu-enkephalin and its [*D*-Arg<sup>2</sup>]-analog. Comparison of these data suggests that among stable structures of [*D*-Arg<sup>2</sup>]-enkephalin the conformers *BHHBB* and *BLRBB* have the highest probabilities in solution. These conformations are different from «biologically active» conformations of enkephalin molecule proposed in literature.