



УДК 547.964.4.02:543.42

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ПЕПТИДА δ -СНА И ЕГО АНАЛОГОВ. ЛАЗЕРНЫЕ СПЕКТРЫ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Набиев И. Р.

Московский инженерно-физический институт

*Саргсян А. С., Ефремов Е. С., Михалева И. И.,
Иванов В. Т.*

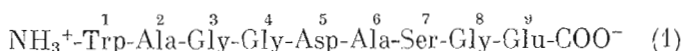
*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Проведен сравнительный анализ спектров КР пептида δ -сна и серии его тирозинсодержащих аналогов. Замена остатков Ser⁷ и Gly⁸ на остатки Trp не оказывает существенного влияния на конформацию дивиттер-ионной формы нативного пептида. В этой конформации присутствует β -изгиб, а остатки Trp⁷ и Trp⁸ сближены с NH₃⁺-концевой группой. При этом Trp¹ имеет гидрофобный контакт с Ala² или Ala⁶. Замена остатков Ala⁶ на остаток Trp приводит к переходу участка β -изгиба в неупорядоченную форму. При этом концевая NH₃⁺-группа уже не оказывает влияния на остаток Trp, а гидрофобные контакты остатка Trp нарушаются. Протонирование COO⁻-групп или депротонирование NH₃⁺-групп приводит к конформационной перестройке. Из анализа спектров КР можно предположить, что молекула пептида δ -сна в водном растворе имеет свернутую конформацию с β -изгибом на участке последовательности 6-9.

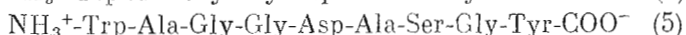
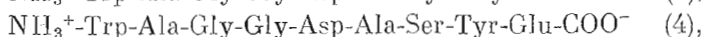
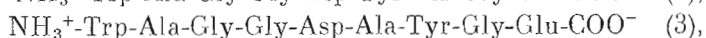
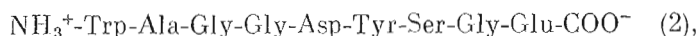
В последние годы значительно возрос интерес к изучению нейропептидов как медиаторов и модуляторов различных физиологических процессов — боли, сна, памяти и др. Одним из гуморальных факторов, вызывающих и поддерживающих сон, является пептид δ -сна, который, по данным Монье, Шоненбергера и сотр. [1-4], вызывает у кроликов (а также и у других видов животных) электроэнцефалографические и поведенческие изменения, характерные для медленноволновой фазы (δ -фазы) сна.

Мы проводим исследование взаимосвязи между структурой этого эндогенного нонапептида и его биологической функцией. Синтезу пептида δ -сна и ряда его аналогов, а также обсуждению первых результатов физико-химических и биологических исследований посвящено сообщение [5], детали синтеза и условия биологического тестирования приведены в работе [6].

Настоящая работа посвящена исследованию пептида δ -сна



и его тирозинсодержащих аналогов



методом лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния (КР). Метод спектроскопии КР пока еще недостаточно широко применяется для изучения олигопептидов, хотя при изучении белков с его помощью достигнут значительный прогресс [7]. Объясняется это прежде всего тем, что структура гетероолигопептида обычно не может быть представлена в виде набора фрагментов, имеющих канонические структуры (α , β и т. п.), реали-

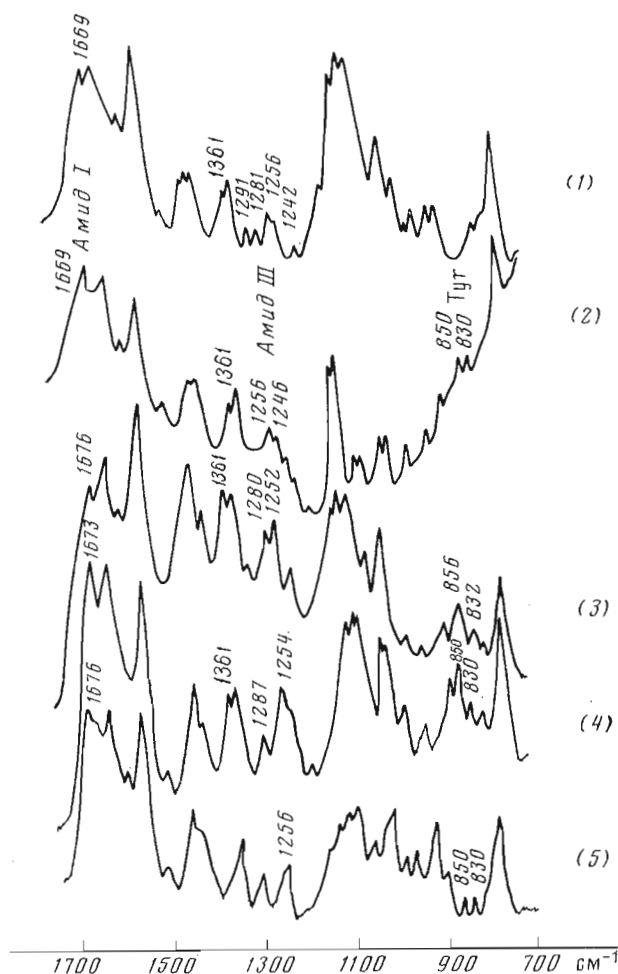


Рис. 1. Спектры КР пептида δ -сна (1) и его аналогов [Tyr⁶]- (2), [Tyr⁷]- (3), [Tyr⁸]- (4), [Tyr⁹]- (5) при pH 6,5

зюемые, например, в регулярных полипептидах [7, 8]. Вместе с тем в ряде случаев короткие пептиды могут служить простейшими моделями таких регулярных участков структур, как β -изгибы различных типов [9]. Поэтому изучение спектров КР олигопептидов позволяет не только получить информацию о конкретном объекте, но и расширить возможности метода в конформационном анализе пептидно-белковых систем.

Спектр КР водного раствора пептида δ -сна (1) в области 700—1750 см^{-1} приведен на рис. 1. Отнесения полос даны в таблице. В спектре КР пептида (1) колебание Амид I проявляется в виде полосы сложного профиля с максимумом 1669 см^{-1} , а Амид III — в виде двух пар дублетных полос: 1256 и 1242 см^{-1} , 1281 и 1291 см^{-1} . Такое отнесение полос подтверждено съемкой спектров в $^2\text{H}_2\text{O}$. Из анализа спектров КР полипептидов с известной вторичной структурой, большого количества белков, а также теоретических расчетов были получены корреляции между типом регулярной структуры и диапазоном наблюдаемых частот Амид I и Амид III [7, 10]. Известно также, что при усилении или образовании водородных связей с участием пептидных групп происходит повышение частот полос Амид III и понижение частоты Амид I. В случае пептидов эффект водородных связей на спектр КР может быть весьма значителен. Формально положение полос Амид I и низкочастотного дублета Амид III в спектре КР пептида (1) хорошо согласуется с «неупорядоченной структурой», что кажется вполне вероятным для конформации коротких пептидов в водном растворе. Что же касается высокочастотной пары полос Амид III (1281, 1291 см^{-1}),

Данные спектров комбинационного рассеяния (ν , см^{-1}) пептида δ -сна (1) и его аналогов (2)–(5)

Спектральные характеристики	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Амид I	1669	1669	1676	1673	1676
Амид III	1242 1256 1281 1291	1246 1256	1252 1280	1254 1287	1256
Присутствие полос 1361 см^{-1} (Trp) I_{850}/I_{830}	+ —	+ 1,2	+ 2,4	+ 2,6	— 1,1

то их следовало бы отнести к участкам в α -спиральной конформации. Однако в этой же области могут оказаться и колебания, отвечающие β -изгибам [9]. Для сравнительно короткого пептида трудно допустить существование устойчивой α -спирали: даже для гомопептидов спирализация начинается лишь с гептапептида [11]. В девятичленном пептиде сна при наличии α -спирали практически вся интенсивность полос Амид I и Амид III должна бы быть сосредоточена в областях 1645–1660 и 1265–1300 см^{-1} соответственно. На самом же деле в спектре пептида (1) интенсивности полос 1281 и 1291 см^{-1} составляют не более 30% общей интенсивности полос Амид III. Таким образом, естественно связать эту высокочастотную пару полос с наличием β -изгибов в структуре пептида. При этом низкочастотный дублет 1242, 1256 см^{-1} обусловлен неупорядоченной формой пептида.

Изменения в спектре КР пептида δ -сна при рН-титровании показаны на рис. 2. При переходе в сильнокислую и сильнощелочную среду происходит уширение и сглаживание низкочастотного дублета Амид III, а также некоторое уширение полос Амид I и исчезновение одной из полос высокочастотного дублета Амид III. Эти спектральные изменения можно объяснить изменением структуры пептида, происходящим при изменении ионного состояния COO^- - и NH_3^+ -групп, поскольку при рН 1,9 и рН > 11,5 они должны быть протонированы и депротонированы соответственно.

Остатки триптофана дают ряд полос, из которых наиболее информативна полоса $\sim 1360 \text{ см}^{-1}$. Высокая интенсивность этой полосы в спектре пептида (1) может свидетельствовать о гидрофобных контактах индольного кольца остатка Trp с неполярными боковыми цепями других остатков (возможно, Ala^2 или Ala^6) [7]. С ростом температуры интенсивность полосы 1360 см^{-1} (по сравнению с полосой 1340 см^{-1}) увеличивается (рис. 3), как и следовало ожидать для конформации, стабилизированной гидрофобными взаимодействиями [12]. Отметим также, что гидрофобные контакты остатка Trp не связаны с межмолекулярной ассоциацией пептида, поскольку в диапазоне концентраций 15–120 мг/мл интенсивность полосы 1360 см^{-1} не меняется. Интенсивность полосы 1360 см^{-1} при переходе как в кислую, так и в щелочную область существенно падает, что свидетельствует о нарушении гидрофобных контактов этого остатка.

Среди спектров всех изученных нами аналогов спектр пептида (2) наиболее сильно отличается от спектра нативного пептида δ -сна (таблица). В области Амид III наблюдается лишь широкая полоса в районе 1250 см^{-1} и отсутствуют высокочастотные компоненты, относимые к участкам β -изгибов. Резкие отличия наблюдаются и в области C—C- и C—N-колебаний — чувствительных маркеров конформационного состояния. В спектре наблюдаются полосы, принадлежащие колебаниям боковой цепи остатка Trp⁶, из которых дублет в области 850, 830 см^{-1} может служить для определения состояния остатка тирозина в молекуле. Известны корреляции, связанные с отношением интенсивностей полос дублета [13]. Для рассматриваемого аналога отношение интенсивностей полос (I_{850}/I_{830}) составляет 1, 2, что характерно для «нормального», т. е. «открытого», не участвующего в сильной водородной связи, тирозина. Состояние остатка Trp¹ сходно с его состоянием в пептиде (1).

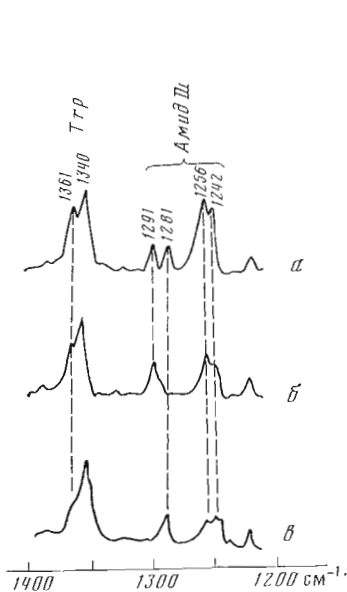


Рис. 2

Рис. 2. Спектры КР пептида δ -сна при pH 7,0 (а), 4,9 (б), 11,9 (в)

Рис. 3. Спектры КР пептида δ -сна в области 1300–1380 см^{-1} при pH 6,5 и температуре 25 (а) и 65° С (б)

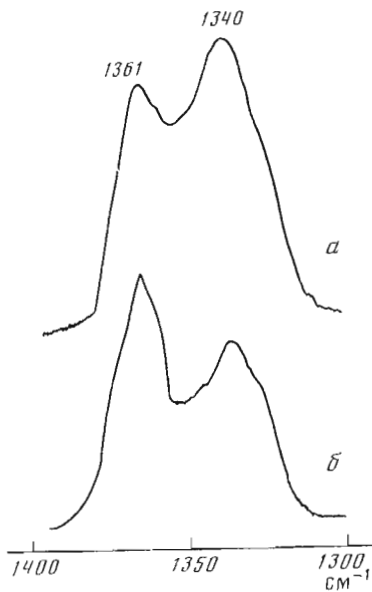


Рис. 3

Спектр КР аналога (3) весьма сходен со спектром пептида (1). В области Амид III имеются высокочастотные (1280 см^{-1}) и низкочастотные (1250 см^{-1}) полосы, хотя они и несколько маскируют друг друга из-за взаимного перекрывания и уширения полосы 1250 см^{-1} . Отношение интенсивностей полос тирозинового дублета составляет 2,4, что характерно для фенольной гидроксильной группы, участвующей в сильной водородной связи в качестве акцептора протона или сближенной с положительно заряженной группой [13]. Такой заряд в молекуле аналога может нести только NH_3^+ -концевая группа.

Спектр аналога (4) в области полос Амид I и Амид III, так же как и аналога (3), близок к спектру нативного пептида. Отметим лишь, что высокочастотная полоса Амид III проявляется в виде острого пика с максимумом 1287 см^{-1} . Отношение интенсивностей полос I_{850}/I_{830} составляет 2,6, что, как и в аналоге (3), может быть объяснено сближенностью с NH_3^+ -концевой группой.

В спектре аналога (5) колебание Амид III наблюдается в виде резкой полосы с максимумом 1256 см^{-1} , что характерно для неупорядоченной формы. Отношение интенсивностей полос тирозинового дублета равно 1,1, что соответствует «нормальному» состоянию остатка Тир⁹. В отличие от всех предшествующих аналогов полоса Тгр¹ при 1360 см^{-1} сильно подавлена. Очевидно, включение тирозина в 9-е положение вместо глутаминовой кислоты сильно меняет окружение индольного кольца триптофана.

Таким образом, из анализа спектров КР изученных аналогов пептида δ -сна следует, что замена остатков в 7-м и 8-м положениях на остатки Тир не приводит к значительному изменению конформации пептида, тогда как аналогичные замены остатков Ala⁶ и Glu⁹ существенно влияют на его конформационное состояние. На основании этих данных, а также с учетом того факта, что изменение ионного состояния NH_3^+ - и COO^- -групп влияет на стабильность β -изгибов пептида, можно предположить, что молекула пептида δ -сна имеет в водном растворе свернутую конформацию с β -изгибом на участке 6–9.

Экспериментальная часть

Синтез пептидов (1) — (5) описан в работе [6].

Спектры КР водных растворов пептида δ -сна и его аналогов получены на Раман-спектрометре фирмы «Jobin — Yvon» «Ramanog HG-2S» с двойным монохроматором на вогнутых голографических решетках и фотоумножителем типа RCA-c31034. Спектры записывались при концентрации 90–110 мг/мл, pH 6,5 и температуре 25°С. Для возбуждения спектра использовали линию 514,5 нм Ar^+ -лазера фирмы «Spectra-Physics», модель 164-03. Съемку спектров проводили в пирексовых капиллярах с внутренним диаметром 1 мм. Для устранения плазменных линий, лежащих вблизи от возбуждающей линии, на пути лазерного луча ставили соответствующие интерференционные фильтры. Для растворов с концентрацией ≤ 50 мг/мл проводили накопление спектров в аналоговом режиме и их обработку с помощью компьютера фирмы «Nicolet», модель 1180. Спектры получали при мощности лазера 200–250 мВт.

Напряжение на ФЭУ составляло 1180 В, скорость сканирования 20 см⁻¹/миц, временная константа 1,8 с⁻¹, ширина щели 800 мкм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monnier M., Dudler L., Gachter R., Maier P. F., Tobler H. J., Schoenenberger G. A. *Experientia*, 1976, v. 33, № 4, p. 548–552.
2. Schoenenberger G. A., Monnier M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 3, p. 1282–1286.
3. Schoenenberger G. A., Maier P. F., Tobler H. J., Monnier M. *Pflugers Arch.*, 1977, v. 369, № 1, p. 99–109.
4. Monnier M., Dudler L., Gachter R., Schoenenberger G. A. *Neurosci. Lett.*, 1977, v. 6, № 1, p. 9–13.
5. Ivanov V. T., Mikhaleva I. I., Sargsyan A. S., Balushova T. A., Efremov E. S., Deshko T. N., Nabiev I. R., Balaban P. M. In: *Proc. XVI European Peptide Symp.*, Copenhagen, 1980.
6. Саргсян А. С., Сумская Л. В., Александрова Н. Н., Безруков М. В., Михалева И. И., Иванов В. Т., Балабан П. М. *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 8, с. 1125–1149.
7. Carey P. R., Salares V. R. In: *Advances of infrared and Raman spectroscopy*, 1980, v. 7, p. 1–58.
8. Yu T.-J., Lippert J. L., Peticolas W. L. *Biopolymers*, 1973, v. 12, p. 2161–2176.
9. Deslauriers R., Leach S. J., Maxfield F. R., Minasian E., McQuir J. R., Meinwald Y. C., Nemethy G., Pottle M. S., Rae I. D., Scheraga H. A., Stimson E. R., Van Nispen J. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, v. 76, № 6, p. 2512–2514.
10. Хабиев И. Р., Плужников К. А., Траханов С. Д., Ефремов Е. С., Цеглин В. П. *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 6, с. 836–846.
11. Fasman G. D., Itoh K., Liu C. S., Lord R. C. *Biopolymers*, 1978, v. 17, № 1, p. 125–143.
12. Pratt L. R., Chandler D. J. *Chem. Phys.*, 1977, v. 67, № 8, p. 8–34.
13. Siamwiza M. N., Lord R. C., Chen M. C., Takamatsu T., Harada I., Matsuura H., Shimanouchi T. *Biochemistry*, 1975, v. 14, № 22, p. 4664–4668.

Поступила в редакцию
27.1.1982

SPATIAL STRUCTURE OF DELTA-SLEEP-INDUCING PEPTIDE AND ITS ANALOGS. LASER RAMAN SPECTRA

NABIEV I. R., SARGSYAN A. S., EFREMOV E. S.,
MIKHALEVA I. I., IVANOV V. T.

*Moscow Physical-Engineering Institute, Moscow; M. M. Shemyakin Institute
of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A comparative study of Raman spectra of delta-sleep-inducing peptide (DSIP) and its Tyr-containing analogs has been carried out. The replacement of Ser⁷ or Gly³ by Tyr residues has no marked influence on the zwitter-ionic form of the native peptide. Its conformation is characterized by the presence of a β -turn and by the proximity of the Tyr⁷ and Tyr⁸ residues to the NH_3^+ -terminal group; Trp¹ has a hydrophobic contact with Ala² or Ala⁶. The replacement of Ala⁶ by Tyr residue results in transformation of the β -turn to unordered structure with the concomitant abolishment of the α - NH_3^+ -group effect on the state of the Tyr residue and destruction of the Trp hydrophobic contacts. The protonation of COO^- or deprotonation of NH_3^+ group cause the conformational changes. It is suggested from the analysis of the Raman spectra that in aqueous solution DSIP has a folded conformation with the β -turn in 6-9 position.